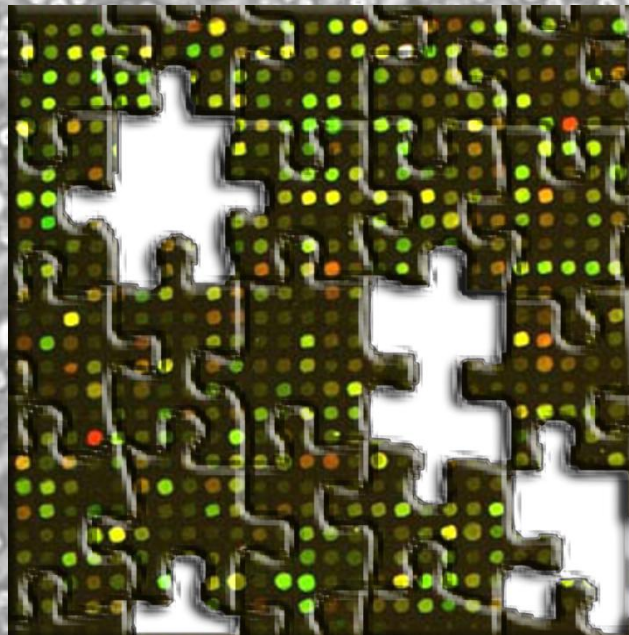


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Bioquímica

**EXPRESIÓN GÉNICA
ALTERADA EN OBESIDAD.
ESTUDIO DE LOS GENES Y
RUTAS METABÓLICAS
IMPLICADAS**



CARMEN HURTADO DEL POZO

TESIS DOCTORAL

MADRID 2011

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**EXPRESIÓN GÉNICA ALTERADA EN OBESIDAD. ESTUDIO DE LOS GENES Y
RUTAS METABÓLICAS IMPLICADAS**

Memoria que presenta la licenciada en Biología
Carmen Hurtado del Pozo para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras de Tesis:

Dra Rosa María Calvo Vargas

Dra M^a Jesús Obregón Perea

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM



Doña **M^a Jesús Obregón Perea**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid, y Doña **Rosa María Calvo Vargas**, Doctora en Farmacia, investigadora contratada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Madrid, CERTIFICAN que:

Doña Carmen Hurtado del Pozo, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "**EXPRESIÓN GÉNICA ALTERADA EN OBESIDAD. ESTUDIO DE LOS GENES Y RUTAS METABÓLICAS IMPLICADAS**"

y consideran que el trabajo realizado reúne todas las condiciones requeridas, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 6 de Abril del 2011

Vº Bº Tutor de la Tesis

Fdo. M^a Jesús Obregón Perea
Directora de la tesis doctoral

Fdo. Rosa María Calvo Vargas
Codirectora de la tesis

Fdo. Juan Bernal Carrasco
Profesor Honorario del
Departamento de Bioquímica

Este trabajo ha podido llevarse a cabo gracias a la financiación de los proyectos SAF2006-01319 y SAF2009-09364 del Plan Nacional de Investigación Científica (I+D+I), el Centro de Investigación Biomédica en Red de Obesidad y Nutrición (CIBERObn) y el proyecto FMM20060835

A mi abuela Milagros

Agradecimientos...

Son muchas las personas que han hecho posible esta tesis doctoral, tanto a nivel científico como a nivel personal y no sé si seré capaz de reflejar con palabras mi agradecimiento...

En primer lugar quiero expresar mi gratitud a la Dra M^a Jesús Obregón por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas científicas y humanas, por la confianza que siempre ha depositado en mí y por la libertad que me ha dado a lo largo de estos años para realizar este trabajo. Del mismo modo quiero agradecer a mi codirectora de tesis, la Dra Rosa María Calvo. Esta tesis es tanto tuya como mía. Gracias por enseñarme cada día todo lo que ahora sé, por tus horas de dedicación y por tu paciencia, me has enseñado el tipo de investigadora que quiero ser.

El trabajo experimental que recoge esta memoria no hubiera sido posible sin la colaboración del Dr Vesperinas y su equipo de cirugía en el Hospital Universitario de la Paz, el Dr Miguel Ángel Rubio y el Dr Antonio Torres-García del Hospital Clínico de Madrid, y la Dra Gema Frühbeck y el Dr Javier Gómez-Ambrosi de la Clínica Universitaria de Navarra, gracias a todos ellos por la aportación científica y recogida de estas valiosas muestras, sin las cuales este estudio no se hubiera llevado a cabo. Y por supuesto debo agradecer a todos aquellos pacientes que accedieron a dar su consentimiento para ser incluidos en este trabajo.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Raquel, M^a Asun y la recién llegada Laura, cada una de vosotras me ha ayudado en estos años. M^a Asún no sabes todo lo que te echamos de menos cuando te fuiste, tus consejos de madre nos han servido a todas cada día de trabajo. Raquel, gracias por tu ayuda en el labo pero sobre todo gracias por tu amistad. Laura, la última en llegar, mil gracias por tu ayuda estos últimos meses, sin ella los cultivos hubieran acabado conmigo.

Gracias a Javi, Sergio y Dani, mis compañeros de cumpleaños, celebraciones y sobremesa, pero sobre todo mis amigos del IIB. Mil gracias por tan buenos momentos compartidos, por hacerme reír siempre incluso cuando los tiempos que corrían no eran de lo mejor... Creo que no se pueden tener mejor gente alrededor día a día como vosotros. A parte de lo personal, también tengo que agradecer a Javi, tus enseñanzas víricas, espero que nuestra colaboración siga adelante y publiquemos mucho mucho y mucho.

Gracias a las chicas 1.11, María, Vero y María ("Gallarda, te incluyo ya en el 1.11 que últimamente me tienes abandonada en cultivos"). Las primeras personas que conocí en el IIB!! Me acogisteis como una más y es de agradecer. Esperemos con el buen tiempo retomar la happy hour no?? María, el próximo año ni tesis, ni piso, otra semanita en Grand Valira!!

Gracias a Carliños, Mary, Cristina, Beñat, Jesús, Sarita, Ianire y Cristinita (diminutivo para diferenciar sólo) mis amigos desde la facultad... en estos últimos años todo ha cambiado, pero no se que tenemos que yo no puedo dejaros de veros ni una semana. Gracias, por los fines de semana, los jueves de cañas, las discusiones, los conciertos, festivales, cumpleaños... Gracias por teneros como amigos. Mary, gracias porque siempre has estado cuando te he necesitado!

La siguiente persona merece un apartado para él solo. Julio, gracias a ti estoy ahora escribiendo estos agradecimientos, gracias por animarme a entrar en este mundo, tu ilusión por la investigación me contagió, gracias por los ánimos, la tranquilidad que me has transmitido, sobre todo estos últimos meses, gracias por preguntar cada día “qué tal el día?” Gracias por hacerme valorar lo afortunada que soy, gracias por hacerme ser la persona que ahora soy.

Y por último, y por ello los más importantes, gracias a mis padres, por apoyarme en todas mis decisiones, por haberme transmitido la idea de compromiso y dedicación al trabajo, por haberme transmitido el interés por conocer y aprender cosas nuevas, gracias por vuestra paciencia, por vuestro amor incondicional, gracias, por el esfuerzo infinito que habéis hecho para que yo pudiera conseguir mis metas.

A mi abuela... gracias por ser un ejemplo a seguir.

Resumen

La obesidad se puede definir como un desequilibrio prolongado entre ingesta calórica y gasto energético que conduce a un incremento de la grasa corporal provocando el desarrollo de enfermedades como diabetes tipo 2, daño cardiovascular, hipertensión y cáncer. La distribución anatómica del tejido adiposo desempeña un papel muy importante en el desarrollo de estos daños metabólicos. El tejido adiposo visceral está asociado con el desarrollo de enfermedades metabólicas. Por el contrario, el tejido adiposo subcutáneo está asociado con una mejora en la sensibilidad a la insulina. Las diferencias fisiológicas de ambos depósitos han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, conocemos poco de las bases moleculares involucradas en las características de estos dos depósitos. Por tanto, pensamos que conocer el perfil de expresión génica de cada depósito es necesario para la comprensión de los mecanismos involucrados en los desórdenes metabólicos asociados a la obesidad. Mediante el uso de microarrays de ADN identificamos cambios de expresión génica en tejido adiposo omental y subcutáneo en pacientes obesos mórbidos *versus* pacientes delgados, y evaluamos por PCR a tiempo real el perfil de expresión de genes potencialmente relacionados con las vías lipogénicas y lipolíticas, entre otros procesos. Este análisis reveló una expresión génica alterada en enzimas, factores de transcripción y proteínas de señalización involucrados en el metabolismo lipídico algunas de las cuales nunca antes habían sido descritas en obesidad. Con estos resultados podemos sugerir que en el tejido adiposo de obesos mórbidos se inhibe la expresión de genes involucrados en las vías lipogénicas y lipolíticas como mecanismo de defensa ante una excesiva acumulación y expansión de grasa. Entre los genes inhibidos en tejido adiposo se encuentra el ChREBP, un factor de transcripción fundamental para la expresión de las enzimas lipogénicas y que muestra una expresión génica opuesta en hígado, lo que ayudaría a explicar en parte, el exceso de grasa que se produce en tejidos extra-adiposos cuando la capacidad de expansión del tejido adiposo se satura.

Summary

Obesity can be defined as the excessive accumulation of adipose tissue caused by a chronic energy imbalance between energy intake and energy expenditure. The consequences of excess body fat are numerous and include type 2 diabetes, hypertension, coronary artery disease, and many types of cancer. The anatomic distribution of adipose tissue plays an important role in the development of these metabolic disorders. Central obesity, characterized by an accumulation of intra-abdominal fat, is associated with insulin resistance, high risk of type 2 diabetes, dyslipidemia and atherosclerosis, while peripheral obesity or subcutaneous fat is not associated with these pathologies, and otherwise it is associated with a low risk of developing them and with the improvement of insulin sensitivity. The physiological differences of these different depots has been intensively investigated. However little is known regarding the molecular mechanisms involved. We think that knowing the gene expression profile of each depot is necessary to understand the mechanisms involved in the metabolic disorders associated to obesity. Using DNA microarrays we identified changes in gene expression in subcutaneous and visceral with adipose tissue in morbidly obese versus lean patients, and evaluated by Real Time PCR the expression profile of genes potentially related to lipogenic and lipolytic pathways, among other processes. The using microarrays analysis revealed an altered gene expression in transcription factors, enzymes and signaling proteins involved in lipid metabolism. Interestingly, some of these genes have never been described in obesity. These findings suggest that adipose tissue from obese subjects entails defense mechanisms against excessive expansion and fat accumulation, repressing genes in both lipogenic and lipolytic pathways. Among the inhibited genes in adipose tissue is the ChREBP, a transcription factor essential for the expression of lipogenic enzymes and showing opposite expression in the liver, which help to explain in part the excess of fat that accumulates in extra-adipose tissues when adipose tissue expandability is saturated.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

<i>Agradecimientos</i>	5
<i>Resumen</i>	7
<i>Summary</i>	8
<i>Índice</i>	10
<i>Abreviaturas</i>	12
1. Introducción.....	15
1.1 Concepto y clasificación de la obesidad.....	15
1.2 Fisiopatología de la obesidad: Balance energético.....	16
1.3 El tejido adiposo.....	18
1.3.1 Componentes celulares del tejido adiposo.....	19
1.3.2 Tejido adiposo como órgano endocrino.....	21
1.3.3 Tejido adiposo y resistencia insulínica.....	22
1.4 Metabolismo lipídico.....	24
1.4.1 Regulación del metabolismo lipídico: Lipólisis y lipogénesis.....	26
Lipogénesis.....	26
Regulación transcripcional de la lipogénesis: SREBP1C y ChREBP.....	28
Lipólisis.....	31
Regulación de la lipólisis.....	32
1.5 Aplicación de microarrays de ADN en el estudio de la obesidad.....	33
2. Objetivos.....	36
3. Resultados.....	38

IPO8 y FBXL10 son buenos genes referencia en estudios de expresión génica en tejido adiposo SC y OM así como en preadipocitos humanos.....	38
Perfil de expresión en tejido adiposo OM y SC en tejido adiposo de sujetos delgados y obesos. Represión de genes involucrados en vías lipogénica y lipolíticas.....	46
Estudio de la expresión en obesidad del factor de transcripción ChREBP en hígado, tejido adiposo y preadipocitos humanos diferenciados.....	58
4. Discusión.....	68
Análisis de la expresión génica de tejido adiposo SC y OM en obesidad mórbida mediante el uso de microarrays de ADN.....	71
Validación de microarrays: Inhibición de la expresión de genes lipolíticos y lipogénicos.....	74
➤ Regulación transcripcional de la lipólisis en tejido adiposo de obesos mórbidos.....	74
➤ Regulación transcripcional de lipogénesis en hígado y tejido adiposo.....	78
5. Conclusiones.....	83
6. Bibliografía.....	86
7. Anexos.....	106
➤ Anexo I.....	106
➤ Anexo II.....	110

ABREVIATURAS

ACACB	Acetil carboxilasa 2
ACL	Citrato liasa
ACOX2	Acil-Coenzima A oxidasa 2
ADYC1	Adenilato ciclasa 1
ADYC2	Adenilato ciclasa 2
ADYC3	Adenilato ciclasa 3
ADYC4	Adenilato ciclasa 4
ADYC5	Adenilato ciclasa 5
ADYC6	Adenilato ciclasa 6
AGRP	Proteína relacionada agouti Agouti-related peptide
AP1	Proteína activadora 1
ATGL	Lipasa de triglicéridos de adipocitos o Desnutrina
AZGP1	Glicoproteína alfa zinc 1
bHLH/LZ	Dominio Cremallera de leucina
C.V.	Coefficiente de variación
CART	Transcrito regulado por cocaína y por anfetamina (<i>Cocaine- and amphetamine- regulated transcript</i>)
CEBP	Proteína que se liga al elemento CAAT del promotor (<i>CAAT Enhancer binding protein</i>)
ChORE	Elemento de respuesta a carbohidratos
ChREBP	Factor de transcripción de respuesta a carbohidratos
CIDEA	<i>Cell death-inducing ADN fragmentation factor-like effector A</i>
CPT1	Carnitina palmitoiltransferasa 1
DGAT	Diacilglicerol transferasa
ECHDC	Enoil Coenzima
EST	Marcador de secuencia expresada (<i>Expressed sequence tag</i>)
FASN	Ácido graso sintasa
FBXL10	<i>F-box and leucine-rich repeat protein-10</i>
FOXO1A	<i>Forkhead box O12 1A</i>
FRU6P	Fructosa 6 fosfato
FXR	Receptor farnesoide X
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GLUT2	Transportador de glucosa tipo 2
GLU6P	Glucosa 6 fosfato
GYS1	Glicógeno sintasa 1
HOXA7	Homeobox protein Hox-A7
HSL	Lipasa sensible a hormona
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ICC	Índice Cintura-Cadera
IL6	Interleuquina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
IPO8	Importina 8
KLF	<i>Krüppel like factor</i>
LPK	L-Piruvato kinasa
Mlx	Factor X semejante a MAX

LPR10	Receptor de lipoproteína de baja densidad relacionado con proteína 10
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
ME	Enzima málico
MGL	Lipasa de monoglicéridos
MGPAT	Glicerol-3-fosfato-aciltransferasa
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
NCOA6	Coactivador 6 del receptor nucleolar
NDRG4	<i>N-Myc downstream-regulated gene 4</i>
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NPY	Neuropeptido Y
OM	Omental
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
PIAS3	Proteína inhibidora de STAT activa 3
PKA	Proteína kinasa A dependiente de AMPc
PKF	Fosfofructoquinasa
POMC	Pro-opiomelanocortina
PP2A	Proteína fosfatasa 2
PPARG	Receptor gamma activador de la proliferación de peroxisomas (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>)
Pro	Prolina
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PYGM	Glicógeno fosforilasa
PYY	Péptido tirosina tirosina (<i>Peptide tyrosine tyrosine</i>)
RBP4	Proteína transportadora de retinol 4
S100A8	Calgranulina A
S100A9	Calgranulina B
SAA	Amiloide sérico A
SC	Subcutáneo
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SNP	Polimorfismos de nucleótido simple
SREBP1C	Isoforma 1c de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides <i>Sterol regulatory element binding protein-1-c</i>
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TG	Triglicéridos
TNFA	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α . “Tumor Necrosis Factor alpha”)
TNMD	Tenomodulina
TZD	Tiazolidindionona
UCP3	Proteína desacoplante mitocondrial 3
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
Xu-5-P	Xilulosa-5-fosfato
ZBTB16	Proteína 16 con dedos de zinc y un dominio BTB

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es la enfermedad metabólica más prevalente en el mundo occidental y su frecuencia se ha incrementado de manera alarmante en países desarrollados durante los últimos años, convirtiéndose en un problema de salud mundial, ya que provoca patologías como diabetes tipo II, daño cardiovascular, hiperlipidemias y cáncer (Lean, 2000).

En España el 54,5 % de la población padece obesidad o sobrepeso. En el resto del mundo, según los últimos cálculos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay más de mil millones de adultos con sobrepeso y al menos 300 millones clínicamente obesos. Se calcula que en el año 2015 habrá aproximadamente 2300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad en todo el mundo, lo que convierte a esta patología en la nueva pandemia del siglo XXI.

1.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN DE LA OBESIDAD

La obesidad se define clínicamente, como un aumento de peso corporal, debido a una mayor cantidad de tejido adiposo, de suficiente magnitud, como para producir consecuencias adversas para la salud (Spiegelman and Flier, 2001). En condiciones normales el cuerpo humano contiene una cantidad de tejido graso que varía entre un 15-18% en hombres y entre un 20-25% en mujeres.

Existen tres formas de clasificación de la obesidad: por el Índice de Masa Corporal (IMC), según la distribución corporal del tejido adiposo y atendiendo a la etiología de la enfermedad. La clasificación más utilizada y aceptada a nivel mundial, es la clasificación según el IMC, que es la razón entre el peso del individuo (expresado en kg) y su altura elevada al cuadrado (expresada en metros) (Keys et al., 1972). En la tabla.1 se muestra la clasificación actual de la obesidad de acuerdo con la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO).

La clasificación según la distribución anatómica tiene gran importancia desde el punto de vista clínico, ya que permite valorar el riesgo metabólico y cardiovascular vinculado a la acumulación de la grasa. Podemos distinguir entre la obesidad periférica o ginoide, caracterizada por la acumulación de grasa subcutánea y la obesidad central o androide donde predomina una acumulación visceral. Esta última, más propia de hombres que de mujeres, se asocia con alto riesgo metabólico. La valoración de este tipo de obesidad, se suele hacer mediante la medida de circunferencia de la cintura o por el índice cintura-cadera (ICC). Los valores de riesgo se fijan para la circunferencia de cintura en 95 cm y >1 en el ICC para los varones y para las mujeres en 82 cm y >0.8 respectivamente. Por último desde el punto de vista etiológico, podemos diferenciar entre la obesidad esencial o primaria, debida a una alteración en la regulación del peso, y la obesidad de origen endocrino o secundaria, originada como consecuencia de anomalías endocrinas, hipotalámicas o iatrogénicas.

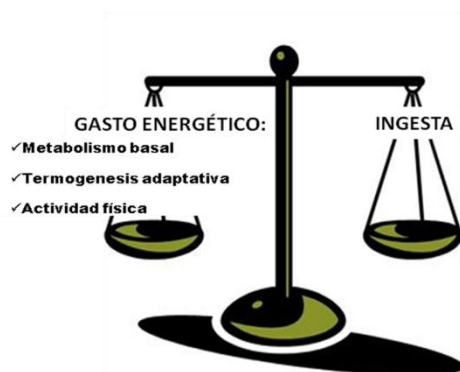
VALORES LÍMITES DEL IMC

< 18	Peso insuficiente
18,5-24,9	Normo peso
25-26,9	Sobrepeso grado I
27-29,9	Sobrepeso grado II
30-34,9	Obesidad tipo I
35-39,9	Obesidad tipo II
40-49,9	Obesidad tipo III (mórbida)
>50	Obesidad de tipo IV (extrema)

Tabla 1. Clasificación del Sobrepeso y la obesidad según el IMC (SEEDO 2000)**1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD: BALANCE ENERGÉTICO**

Para entender la patología de la obesidad, es necesario comprender el concepto de balance energético (Figura 1). La obesidad se produce por un balance energético positivo, debido a un aumento en la ingesta calórica y una disminución del gasto energético. El exceso de ingesta, si no se contrarresta con un mayor gasto energético, conduce al progresivo aumento de la grasa corporal y a la obesidad.

La homeostasis energética, es un proceso clave para el funcionamiento celular, que mantiene la estabilidad de la energía almacenada en forma de grasa corporal. Este proceso implica una clara asociación entre el aporte de energía y el consumo de la misma y su regulación no está completamente esclarecida.

**Figura 1. Regulación de la homeostasis energética.**

El balance positivo de ingesta con respecto al gasto energético se traduce en un aumento de tejido adiposo, principal regulador del almacenamiento del exceso de energía en forma de triglicéridos (TG).

El balance energético está determinado por la primera Ley de la Termodinámica, en la que la energía adquirida (ingesta) es igual a la energía quemada (gasto energético) más la almacenada. Así, el almacenamiento de la energía en forma de lípidos correspondería al exceso de energía ingerida relativa al gasto energético. Los componentes de la ecuación más en detalle son:

- INGESTA ENERGÉTICA

La regulación de la ingesta de alimentos reside en el hipotálamo. El hipotálamo forma parte de un sistema, en el cual se integran la regulación de la composición corporal con la ingesta y el gasto de energía. Una serie de estímulos en diferentes sistemas relacionados con el estado metabólico son recibidos en el hipotálamo, los cuales modulan la liberación de péptidos hipotalámicos que regulan la ingesta alimentaria. Concretamente, el núcleo arcuato es el área más relevante donde se integra la información nutricional originada en los órganos periféricos. En el núcleo arcuato del hipotálamo existen dos poblaciones de neuronas, una que expresa los péptidos orexigénicos Neuropéptido Y (NPY) y Proteína relacionada Agouti (Agouti-related peptide, AGRP) y otra población que expresa los péptidos anorexigénicos Pro-opiomelanocortina (Pro-opiomelanocortin, POMC) y el transcrito regulado por cocaína y por anfetamina (Cocaine- and amphetamine- regulated transcript, CART). Ambos tipos de neuronas son las responsables de la integración de la información sobre el estado nutricional del organismo, siendo directa y diferencialmente sensibles a otras hormonas circulantes como leptina, insulina, ghrelina y el péptido tirosina tirosina (Peptide tyrosine tyrosine PYY), así como otros nutrientes como glucosa, ácidos grasos y aminoácidos (Lenard and Berthoud, 2008)

- GASTO ENERGÉTICO

El gasto energético se divide en cuatro componentes: termogénesis obligatoria o metabolismo basal, termogénesis debida a la actividad física, termogénesis postprandial y termogénesis facultativa (Levine et al., 1999; Sims and Danforth, 1987)

- ✓ El metabolismo basal o tasa metabólica está asociado a las reacciones metabólicas esenciales para el correcto funcionamiento de todos los órganos y para la respiración celular (Sims and Danforth, 1987). El metabolismo basal supone el 60%-70% del gasto energético total de un individuo y se encuentra principalmente regulado por las hormonas tiroideas.
- ✓ La termogénesis debida a la actividad física, se puede subdividir, en la voluntaria, refiriéndose a la producción de calor al hacer deporte o cualquier actividad física, y la termogénesis sin ejercicio físico que acompaña a las actividades físicas no voluntarias como el estilo de vida, la gesticulación y la agitación nerviosa, las contracciones espontáneas del músculo y el mantenimiento de la postura cuando no se está en reposo (Levine et al., 1999).

- ✓ La termogénesis postprandial o efecto térmico de la comida se define como el gasto energético consumido en los procesos de digestión, absorción, procesamiento y aprovechamiento de los nutrientes ingeridos. Se refiere a un 10%-15% del gasto energético basal.
- ✓ La termogénesis adaptativa o facultativa producida fundamentalmente en el músculo y en tejido adiposo marrón, se refiere a la energía disipada en forma de calor en respuesta a cambios ambientales tales como la exposición al frío y la alteración en la dieta así como cuando se requiere un aporte extra de calor (Rothwell and Stock, 1979).

Así, de los nutrientes ingeridos, una pequeña proporción se pierde en las heces, otra es usada en necesidades fisiológicas y una pequeña pero variable proporción es usada en actividad física. La mayor parte de la energía tomada por los alimentos es utilizada en procesos metabólicos y en la producción de calor. Por ello, aunque la mayoría de las terapias contra la obesidad se han centrado en reducir la cantidad de ingesta, datos recientes apuntan a nuevos ensayos que incrementan el gasto energético, concretamente en la termogénesis adaptativa (Tseng et al., 2010)

1.3. EL TEJIDO ADIPOSEO

El tejido adiposo es un órgano secretor, endocrino y paracrino, altamente regulado, que secreta una gran variedad de proteínas y moléculas biológicamente activas, involucradas en el control del balance energético y en la regulación del peso corporal. Es uno de los órganos mayores del cuerpo humano. En un individuo delgado, el tejido adiposo supone 3-4,5 kg del peso corporal pero en un individuo obeso puede alcanzar más de 45 kg (Tran and Kahn, 2010).

En humanos y en el resto de mamíferos, existen dos tipos de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón. Ambos poseen la capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, pero presentan claras diferencias en cuanto a su morfología, distribución, expresión génica así como su función. El tejido adiposo blanco es el órgano específico que almacena energía sobrante en forma de grasa; mientras que el tejido adiposo marrón, tiene una función fisiológicamente opuesta: disipa la energía en forma de calor. Éste se distribuye en las regiones interescapular, supraclavicular, cervical y axilar (Nedergaard et al., 2007) además se puede encontrar en pequeñas cantidades, dentro del tejido adiposo blanco y músculo esquelético, o recubriendo órganos vitales como, corazón, riñón, pulmón, órganos sexuales y médula ósea (Rosen and Spiegelman, 2000). El tejido adiposo marrón se caracteriza principalmente por sus depósitos de grasa multiloculares y por la abundancia de mitocondrias en el citoplasma, a diferencia del tejido adiposo blanco unilocular. Como nuestra investigación se ha centrado en el estudio del tejido adiposo blanco, detallo a continuación la descripción del mismo.

1.3.1 COMPONENTES CELULARES DEL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es un órgano complejo y heterogéneo, no sólo por la localización anatómica sino por los componentes celulares entre los que se encuentran adipocitos, células endoteliales, mesenquimales, vasculares, fibroblastos, células madre pluripotenciales (preadipocitos) y macrófagos (Hauner et al., 1989).

Entre las células sanguíneas presentes en tejido adiposo abundan los monocitos y macrófagos. En obesidad se ha observado un incremento en el número de macrófagos residentes en el tejido adiposo (Weisberg et al., 2003). Los macrófagos residentes en el tejido adiposo pueden estar en dos estados de activación; M1 (estado de inflamación) y M2 (antiinflamatorio) los cuales pueden variar dependiendo del estado del tejido adiposo. En individuos delgados, los macrófagos son principalmente del tipo M2, y se caracterizan por presentar una elevada expresión de genes antiinflamatorios y una elevada capacidad de reparación tisular y angiogénesis (Kershaw and Flier, 2004). Sin embargo, en obesidad, además de aumentar el número de macrófagos en tejido adiposo, aumenta la secreción de factores inflamatorios (Riordan et al., 2009), como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α . “*Tumor Necrosis Factor alpha*”), interleuquina 6 (IL-6. “*Interleukin 6*”), amiloide sérico A (SAA), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) o el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), entre otros (Shoelson et al., 2007) y abundan más los macrófagos tipo M1. Recientemente se ha publicado que la polarización de los macrófagos en ratones obesos depende de la acumulación lipídica. Cuando estos ratones fueron tratados con rosiglitazona, el fenotipo M1 tendía a M2 (Prieur et al., 2011).

Los adipocitos constituyen entre 50%-70% del número total de células en el tejido adiposo (Hauner, 2005). Dentro del adipocito tenemos que diferenciar entre adipocito y preadipocito. Entre los componentes de la fracción del estroma vascular se encuentran las células madre mesenquimales y preadipocitos, que darán lugar a la renovación de las células maduras del tejido (Rodeheffer et al., 2008) un proceso que se mantiene en el adulto, tanto en individuos delgados como obesos (Spalding et al., 2008).

La diferenciación del adipocito es un proceso complejo en el que están involucrados numerosos factores transcripcionales. El receptor activador por proliferación de peroxisomas gamma (*Peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR γ) y varios miembros de la familia de proteínas activadoras de la unión al elemento CAAT de los promotores génicos (CCAAT/*enhancer-binding proteins*, C/EBPs) han sido estudiados en profundidad y son considerados factores cruciales en la determinación del fenotipo del adipocito (Tang et al., 2003). Además estudios recientes han demostrado la participación de numerosos factores que intervienen en la diferenciación como son los factores de tipo “*Kruppel like factor*” (KLF), la ruta de señalización de las proteínas *Wingless*

(Wnt), la proteína activadora 1 (AP-1) y la Isoforma 1c de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP-1c, Sterol regulatory element binding protein-1-c) (Lefterova and Lazar, 2009), que en su conjunto, son los responsables de la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, secreción de adipocinas y del establecimiento del fenotipo celular del adipocito (Cartwright et al., 2007).

El tejido adiposo blanco se distribuye en el cuerpo en dos tipos de depósitos: tejido adiposo Subcutáneo (SC) y tejido adiposo visceral, del cual nos centraremos en el tejido adiposo omental (OM). El tejido adiposo visceral, está contenido en el interior de la cavidad abdominal. Su distribución varía entre hombres y mujeres. Los depósitos de grasa visceral en sujetos delgados representan cerca del 20% del total de grasa corporal en el hombre y aproximadamente el 6% en la mujer. Por el contrario, la grasa subcutánea es más abundante en mujeres que en hombres. Ambos depósitos poseen diferentes efectos metabólicos. El tejido adiposo visceral, posee una mayor actividad metabólica, muestra una menor sensibilidad a insulina y a las drogas antidiabéticas como las tiazolidindionas (TZD) (van Harmelen et al., 2002), pero tiene una mayor sensibilidad a catecolaminas (Arner, 1999) y glucocorticoides a diferencia del tejido adiposo SC (Fried et al., 1998). Además, los adipocitos viscerales presentan una mayor actividad lipolítica que los subcutáneos, tanto en individuos delgados como obesos, especialmente, en estos últimos (Wajchenberg, 2000). SC y OM también difieren en cuanto a la capacidad proliferativa y de diferenciación de sus preadipocitos (mayor en SC) así como en la tasa de apoptosis (mayor en OM) (Tchkonina et al., 2005). Varios estudios han mostrado también la existencia de diferencias en la innervación de SC y OM, tanto en relación a los nervios aferentes motores de cada depósito como a la innervación sensorial que transmite la información procedente de los mismos hacia el cerebro (Kreier et al., 2002; Kreier et al., 2006).

Estudios epidemiológicos han encontrado que el incremento en tejido adiposo OM está asociado con resistencia insulínica, diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis y esteatosis hepática. De acuerdo con esto, la eliminación de tejido adiposo OM resulta en una disminución de niveles de insulina y glucosa (Thorne et al., 2002), mientras que la eliminación de tejido adiposo SC por liposucción no mejora ningún aspecto del síndrome metabólico (Klein et al., 2004). Trabajos de expresión génica realizados en grasa SC y visceral, en ratones y humanos mostraron diferencias en los patrones de expresión en genes del desarrollo (Lefebvre et al., 1998), por lo que han llegado a sugerir, que los depósitos de grasa podrían tener una línea de desarrollo distinta (Gesta et al., 2006). Recientemente se han publicado trabajos en los que se realizaron trasplantes en ratones de tejido adiposo visceral a SC y de SC a la cavidad intra-abdominal. Mientras que en el primero no se vio ningún efecto metabólico sobre el animal, el trasplante de

tejido SC a la cavidad abdominal tuvo efectos beneficiosos en el control del peso y metabolismo, mejorando la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa (Tran et al., 2008).

1.3.2. TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO

Desde que en 1994 J. M. Friedman descubriera la leptina, como molécula sintetizada predominantemente en el tejido adiposo, este tejido ha sufrido una reclasificación a órgano endocrino. Durante los últimos años se han identificado una gran variedad de moléculas secretadas por el tejido adiposo (ver tabla 2) con funciones específicas que repercuten a nivel de homeostasis energética (metabolismo lipídico y de carbohidratos, apetito y termogénesis), respuesta inmune, función reproductora, hemostasia, presión sanguínea y angiogénesis. Estas moléculas son conocidas como adipocitoquinas. Estas citoquinas pueden actuar de manera local (función autocrina) o sistémica (endocrina) y poseen además un papel muy importante en la regulación del metabolismo. La secreción de estas citoquinas se encuentra regulada entre otros factores por el ayuno, la ingesta y obesidad (Hamilton et al., 1995; Hotamisligil et al., 1995; Lefebvre et al., 1998). De esta manera desde una visión “adipocéntrica”, el adipocito se ha convertido en el integrador central del metabolismo, ejerciendo una función directa sobre el cerebro, hígado o el músculo esquelético.

ADIPOQUINAS	EFFECTOS METABÓLICOS
Leptina	Señal de saciedad, inhibe lipogénesis, estimula lipólisis, mejora la sensibilidad a insulina, actividad angiogénica
Adiponectina	Reduce lípidos intracelulares, promueve lipogénesis en adipocitos <i>in vitro</i>
TNF-α	Incrementa en el hígado la lipogénesis <i>de novo</i> , incrementa los niveles de ceramida intracelular, estimula la lipólisis
IL6 (Interleuquina 6)	Estimula la oxidación de ácidos grasos, estimula la lipólisis, incrementa en el hígado la lipogénesis <i>de novo</i>
Resistina	Reduce la sensibilidad a insulina, incrementa la glucosa
Angiotensinógeno	Actúa a través del péptido vasoactivo angiotensina II Correlaciona significativamente con la presión sanguínea
RBP4 (proteína transportadora de retinol)	Reduce la sensibilidad a la insulina, mecanismo no claro
Dehidrogenasa 11-hidroxiesteroidea	Regenera cortisol activo de cortisona
Adipsina	Estimula el almacenamiento de TG en adipocitos incrementando la captación de glucosa y re-esterificación de ácidos grasos. Inhibe lipólisis

Tabla 2. Principales adipocitoquinas secretadas por el tejido adiposo y sus principales efectos

1.3.3. TEJIDO ADIPOSO Y RESISTENCIA INSULÍNICA

En estudios epidemiológicos, se ha visto que la obesidad está asociada con el desarrollo de resistencia insulínica y diabetes mellitus tipo 2. Muchos estudios en tejido adiposo intentan explicar el mecanismo que relaciona obesidad y resistencia insulínica.

Actualmente se barajan tres hipótesis que intentan explicar el desarrollo de la resistencia insulínica: la hipótesis de la alteración de la secreción de las adipocitoquinas, la hipótesis del estado inflamatorio del tejido adiposo y la hipótesis de la expansibilidad del tejido adiposo. Las dos más conocidas son las dos primeras. Sin embargo, quizás, la tercera de las hipótesis sea la más completa puesto que engloba a las dos anteriores (ver figura 2). A continuación, comentaré brevemente las principales características de cada una de ellas.

La primera de las hipótesis se centra en el papel endocrino del tejido adiposo. Cuando el adipocito aumenta de tamaño, se hipertrofia y la maquinaria secretora del tejido adiposo varía y da lugar a ciertas patologías como es la resistencia insulínica. Las adipoquinas más estudiadas son la leptina y adiponectina. Los niveles circulantes de leptina son proporcionales a la cantidad de tejido graso existente, siendo liberada en función de los cambios en el balance energético. Esta hormona actúa en la regulación central del control del apetito y del balance energético, reduciendo la ingesta de alimento e incrementado el gasto energético (Ahima et al., 2000). Al contrario que ésta, la adiponectina aumenta su concentración en condiciones de ayuno.

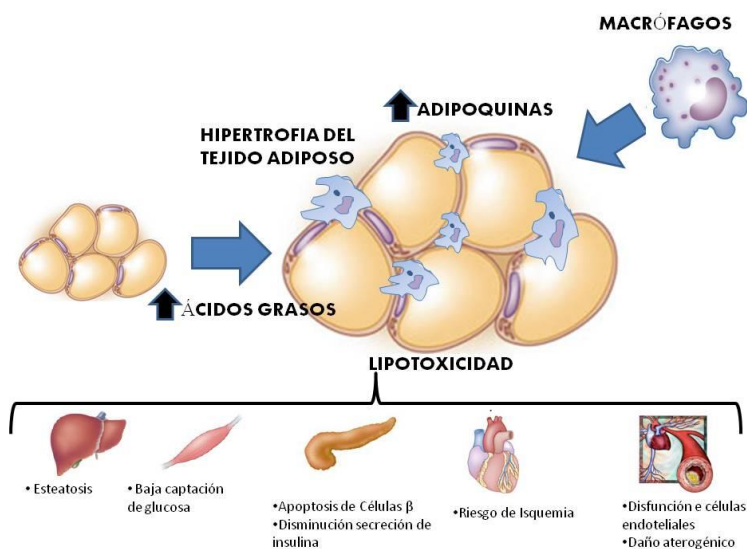


Figura 2. Esquema de interacción entre adipocitos y macrófagos en obesidad.

Adaptado de Cusi et al 2010

El papel de la adiponectina en la insulino-resistencia ha sido ampliamente estudiado, siendo un importante sensibilizador de los niveles de insulina en plasma (Shetty et al., 2009). Es interesante destacar que el nivel de la adiponectina en plasma está inversamente relacionado con el IMC. Así,

en individuos obesos el nivel de adiponectina en plasma es reducido, mientras que la pérdida de peso o el tratamiento con TZD provocan un aumento de su concentración circulante, lo que conlleva una mejoría en la sensibilidad a insulina (Arita et al., 1999) (Brichard et al., 2003). Son varias las adipocinas descritas implicadas en la causa de la resistencia insulínica, tales como RBP4 y resistina. El papel de la resistina en la insulino-resistencia es controvertido ya que en modelos murinos la resistina es secretada por el tejido adiposo, pero en humanos es secretada principalmente por monocitos y macrófagos (Osawa et al., 2005). El papel de la resistina, por tanto, no está aún claro, ya que aunque se ha demostrado que la resistina aumenta la producción de glucosa en el hígado y disminuye la captación y metabolismo de ácidos grasos en el músculo (Steppan and Lazar, 2004), no hay una correlación directa en humanos ni con la obesidad ni con la resistencia a insulina.

Otra de las hipótesis más conocidas es la que se produce por el estado de inflamación del tejido adiposo. Como se mencionó, en la obesidad aumenta el número de macrófagos en tejido adiposo, debido a una mayor infiltración de este tipo celular desde los vasos sanguíneos (Xu et al., 2003), lo que está asociado con un aumento de la secreción de factores inflamatorios. El aumento en la producción de estas moléculas desencadena efectos locales a nivel del endotelio que aumentan la producción de moléculas de adhesión vascular e intercelular (VCAM e ICAM) y modifican la permeabilidad vascular, dando lugar a un aumento en la infiltración de monocitos y de macrófagos en el tejido. A su vez, dichos macrófagos producen más factores quimiotácticos atrayentes de otros macrófagos, lo que ayuda al mantenimiento del estado inflamatorio de bajo grado asociado con la obesidad que, en último término, provoca un deterioro progresivo de la señalización de la insulina (Shoelson et al., 2007; Surmi and Hasty, 2008)

La última de las hipótesis es la hipótesis de la expansibilidad, la cual postula que el tejido adiposo posee una limitada capacidad de expansión de manera que cuando un individuo aumenta su peso corporal y aumenta la masa de tejido adiposo, llega un momento en el que el tejido no puede almacenar más lípidos. Una vez que se excede su capacidad de almacenamiento los lípidos comienzan a depositarse de manera ectópica en órganos no especializados, siendo esta acumulación de ácidos grasos en células tales como miocitos o hepatocitos los que causan efectos tóxicos, como aterosclerosis o hígado graso (Virtue and Vidal-Puig, 2010). No obstante, la cantidad de tejido adiposo no tiene una relación directa con la diabetes ya que hay pacientes obesos que no desarrollan resistencia insulínica ni diabetes y sin embargo hay individuos delgados que las desarrollan (Sims, 2001). Considerando estas situaciones, la OMS tuvo que revisar la definición de Síndrome Metabólico en ciertas poblaciones asiáticas porque las complicaciones del Síndrome Metabólico parecen estar ocurriendo a unos índices de masa corporal mucho más

bajos, en comparación a poblaciones occidentales (Shaw et al., 2000). Son varios los factores que pueden influir en la capacidad de almacenamiento y expansión del tejido adiposo, pero uno de los más importantes es la lipotoxicidad, por ello es necesaria una buena comprensión y regulación del metabolismo lipídico.

1.4. METABOLISMO LIPÍDICO

El metabolismo lipídico del organismo está regulado principalmente por el tejido adiposo, ya que es este tejido el encargado de almacenar el exceso de energía en forma de TG y gestionarlo en periodos de restricción calórica, liberando ácidos grasos. Así pues, alteraciones en el control del balance energético en el tejido adiposo, como aquellas que tienen lugar en condiciones de obesidad, pueden conllevar a la acumulación de ácidos grasos en otros tejidos que aunque involucrados en el metabolismo lipídico, no están especializados en el almacenamiento de ácidos grasos, como hígado y músculo, y con ello, al aumento de la probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus de tipo II, etc. Por lo tanto, la integración de las vías metabólicas específicas de cada tejido junto con los distintos mecanismos reguladores, generalmente mediados por hormonas, aseguran el aporte de nutrientes requerido por cada uno de los tejidos en todo momento, incluso durante el ayuno.

El mecanismo por el cual el tejido adiposo se comunica con el resto de tejidos y órganos para mantener la homeostasis lipídica es a través de la secreción de adipocinas y de la liberación de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos liberados al torrente sanguíneo son ácidos grasos no esterificados (*Non-esterified fatty acids*, NEFA) provenientes de la lipólisis de TG almacenados en el tejido adiposo. Los NEFA, tienen un papel importante a nivel fisiológico en el músculo esquelético, hígado y páncreas. Por ejemplo, se ha demostrado que los NEFA controlan la expresión de genes que codifican para proteína desacoplante mitocondrial 3 (*"Mitochondrial uncoupling protein 3"*, UCP3) en el músculo (Khalfallah et al., 2000) y la enzima carnitina palmitoiltransferasa en los miocitos (Brandt et al., 1998) así como numerosas enzimas lipogénicas en hígado (Dentin et al., 2005a). Sin embargo, una elevada concentración de NEFA en plasma puede provocar consecuencias patológicas y con frecuencia la concentración de ácidos grasos en plasma de pacientes obesos se encuentra elevada. La liberación de NEFA al torrente sanguíneo viene determinada principalmente por la lipólisis en el tejido adiposo SC (Nielsen et al., 2004) mientras que el aporte de NEFA al hígado se debe al tejido adiposo OM (McQuaid et al., 2011). Las altas concentraciones se encuentran asociadas con el incremento de la masa del tejido adiposo (Opie and Walfish, 1963) y con la presencia de diabetes tipo 2 (Frazee et al., 1985), pero, también se ha

visto la ausencia de esta correlación en individuos obesos no diabéticos (Bickerton et al., 2008; Mittendorfer et al., 2009; Reeds et al., 2006).

Como ya se ha mencionado, la homeostasis lipídica depende de la integración de las vías metabólicas específicas de cada tejido. Pero la regulación hígado-tejido adiposo merece especial atención ya que ambos tejidos lipogénicos son los principales órganos capaces de sintetizar ácidos grasos y TG (Wong and Sul, 2010).

El hígado es un órgano importante en el metabolismo lipídico puesto que regula la concentración en sangre de la mayoría de los metabolitos, especialmente la glucosa. La glucosa penetra en el hígado a través del transportador de glucosa 2 (“*transporter glucose 2*”, GLUT2) siendo almacenada en dicho tejido en forma de glucógeno. Sin embargo, cuando hay un exceso de glucosa, ésta entra en la ruta de glucólisis originando los precursores para la lipogénesis *de novo* y aumentando la concentración de lípidos. Estos pueden ser almacenados en forma de TG en el hígado o exportados en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (*Very-low-density lipoprotein*, VLDL). Así, la ingestión de un exceso de energía induce la acumulación de ácidos grasos en el hígado, siendo este un fenómeno bastante común en individuos obesos, con resistencia a insulina, con síndrome metabólico, con esteatopatosis alcohólica y/o con enfermedades que provocan hígado graso no alcohólico (Chen et al., 2007). La insulina regula la concentración de glucosa plasmática inhibiendo la secreción de ésta en el hígado y estimulando la síntesis de glucógeno que se acumula en dicho órgano. En el hígado existen dos mecanismos a partir de los cuales se puede producir glucosa: glucogenolisis y gluconeogénesis. La glucogenolisis produce glucosa durante ayunos cortos y es inhibida por la insulina 1-2 h después de la ingesta (Gastaldelli et al., 2001). Durante periodos de ayuno prolongados, el glucógeno almacenado en el hígado se agota, por lo que se incrementa la actividad gluconeogénica y aumenta la síntesis *de novo* de glucosa a partir de diferentes precursores como piruvato, lactato, glicerol y aminoácidos. Los procesos de gluconeogénesis también aumentan cuando los niveles de insulina plasmática son bajos (diabetes de tipo I) o cuando el hígado es resistente a insulina (obesidad y diabetes mellitus de tipo II) (Weickert and Pfeiffer, 2006).

El aumento de glucosa a partir de glucogenolisis y gluconeogénesis engloba cambios en la actividad de diferentes enzimas que participan en dichos procesos, como la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (“*phosphoenolpyruvate carboxykinase*”, PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa, enzimas que son inhibidas por la acción de la insulina. Además, niveles elevados de glucosa también inhiben la gluconeogénesis al suprimir el gen PEPCK (Nordlie et al., 1999).

1.4.1. REGULACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO: LIPOLISIS Y LIPOGÉNESIS

Las alteraciones en el control del balance energético se traducen en una alteración de los principales procesos que regulan el metabolismo lipídico: la lipogénesis y la lipólisis.

Durante un periodo de aumento de la ingesta o una disminución en la energía gastada, el exceso de energía es almacenado en el tejido adiposo en forma de TG (lipogénesis). Sin embargo, en épocas de ayuno o aumento de energía gastada, la reserva de lípidos se libera mediante lipasas al torrente sanguíneo para ser transportados al hígado, músculo y tejido adiposo marrón donde son utilizados en la oxidación de los ácidos grasos para obtención de energía (lipólisis).

LIPOGÉNESIS

El tejido adiposo es el mayor reservorio de energía del cuerpo humano. La energía se almacena en forma de triacilglicerol dentro del adipocito. Existen dos vías por las cuales el adipocito puede obtener TG: lipogénesis *de novo* y captación de ácidos grasos por la dieta.

En humanos, la mayor fuente de TG proviene de los quilomicrones y VLDL. Ambas partículas son demasiado grandes para penetrar en las células endoteliales de los capilares, por lo que son hidrolizadas en el espacio luminal por la lipoproteína lipasa sintetizada y translocada al lumen de los capilares por los adipocitos (Lafontan and Langin, 2009). Una vez dentro del adipocito, el ácido graso, tóxico para la célula, se esterifica en forma de lípido neutro para su almacenamiento.

La lipogénesis *de novo* tiene lugar únicamente en tejidos lipogénicos como hígado y tejido adiposo (ver figura 3), y se define como la vía metabólica que permite la conversión de un exceso de carbohidratos en ácidos grasos, los cuales son esterificados con glicerol-3-fosfato para formar TG (Ferre and Foufelle, 2010). En humanos, por ejemplo, la síntesis *de novo* ocurre principalmente a nivel hepático mientras que en rata se observa una participación similar de hígado y tejido adiposo (Letexier et al., 2003). En el hígado los TG son sintetizados para la síntesis de VLDL que son secretados al torrente sanguíneo como fuente de energía para otros tejidos. Y en el tejido adiposo, por otro lado, los TG se sintetizan para ser almacenados y poder ser utilizados en periodos de más demanda energética, siendo así el principal reservorio de energía en mamíferos. La actividad lipogénica se encuentra fuertemente regulada bajo condiciones nutricionales. Así una dieta rica en carbohidratos aumenta la actividad lipogénica al aumentar los niveles de insulina y glucosa en sangre, mientras que el ayuno disminuye su actividad cuando los niveles de glucagón circulante y AMPc intracelular aumentan. La regulación de la lipogénesis es a nivel transcripcional de las principales enzimas involucradas que incluyen (ver figura 4): síntesis de ácidos grasos, tales como Citrato Liasa ATP (ACL), Acetil CoA Carboxilasa (ACC) y Ácido Graso Sintasa (FASN); enzimas involucradas en la producción de NADPH requerido para la actividad FASN tales como la enzima málica (ME) y la vía de las

pentosas fosfato tales como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); y enzimas necesarias para la esterificación del ácido graso, como glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (MGPAT) y Diacilglicerol acetil transferasa (DGAT).

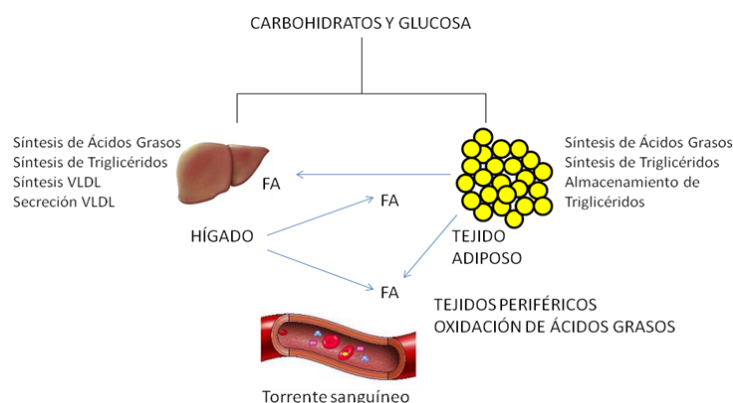


Figura 3. Lipogénesis *de novo* en hígado y tejido adiposo. Esquema adaptado de Roger et al 2010

Algunas de estas enzimas poseen una regulación alostérica bajo el control de algún metabolito concreto, como es el caso de Malonil CoA, que no sólo es sustrato para FASN, además inhibe CPT1 (carnitina palmitoiltransferasa 1) inhibiendo el paso de ácidos grasos a la mitocondria y su posterior oxidación. Otro tipo de regulación es por fosforilación y defosforilación. La ACC, clave en la biosíntesis de ácidos grasos, es fosforilada por AMP-kinasa la cual es sensible a un estado bajo de energía celular. Sin embargo, la principal regulación de las enzimas lipogénicas tanto en hígado como en tejido adiposo, como se ha dicho anteriormente, es a nivel transcripcional. Por ello el estudio de la vía lipogénica a nivel transcripcional, es fundamental para conocer su regulación y respuesta a la insulina y glucosa, a nivel celular y metabólico.

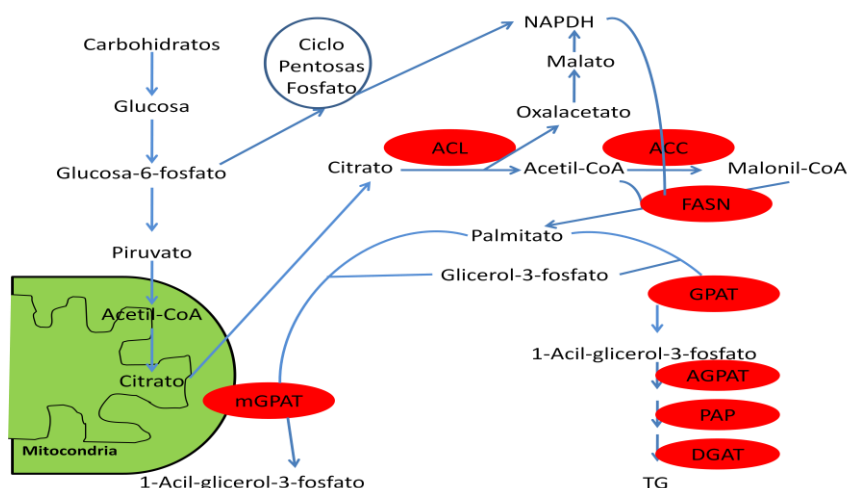


Figura 4. Vía de la lipogénesis y síntesis de TG. ACL, ATP-citrato liasa; ME, enzima málica; ACC, Acetyl-CoA carboxilasa; FAS, Ácido graso sintasa; mGPAT, Glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial; DGAT, Diacilglicerol transferasa; GPAT, glicerol-3-fosfato acetiltransferasa; AGPAT, 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa; PAP, fosfatidato fosfatasa.

Regulación transcripcional de la lipogénesis: SREBP Y ChREBP

Los factores de transcripción que median el efecto transcripcional de la insulina y glucosa en la lipogénesis son: SREBP-1c y la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP, Carbohydrate response element binding protein). Enzimas clave como FASN y ACC requieren de ambos factores para estar completamente activadas (Dentin et al., 2005a; Ferre and Foufelle, 2007)

La activación transcripcional de los genes lipogénicos ha sido atribuida principalmente a la acción de la insulina y en consecuencia, a la activación de SREBP1-c (Osborne, 2000; Shimano, 2002). SREBP-1c pertenece a la familia de los factores de transcripción con un dominio de unión a ADN en forma de hélice-bucle-hélice básico y cremallera de leucinas (bHLH/LZ) que reconoce la secuencia de cajas E (CACGGG), y también el elemento de respuesta a esteroides (SRE). Existen otras dos isoformas, SREBP-2 y SREBP-1a, ambas reguladoras de genes involucrados en la síntesis de colesterol (Brown and Goldstein, 2009). Los SREBPs son sintetizados de forma inactiva en el retículo endoplasmático y se activan mediante la proteólisis de su extremo N-terminal para entrar en el núcleo. De las tres isoformas, sólo SREBP-1c se expresa en tejidos lipogénicos y su importancia en la regulación de genes lipogénicos se vio por primera vez en un estudio en el que la sobreexpresión en el hígado de ratones producía hiperglucemia, hígado graso e hipertrigliceridemia (Shimomura et al., 1998).

Mientras que la regulación de SREBP1c en el hígado ha sido ampliamente estudiada, los factores que regulan la inducción SREBP1c en desarrollo de adipocitos han recibido menos atención. En 1993, el grupo de Spiegelman identificó un factor de transcripción que se expresaba en adipocitos y se regulaba durante la adipogénesis en ratón (Tontonoz et al., 1993). La proteína fue llamada ADD1 para la diferenciación y la determinación del adipocito. El homólogo humano se clonó independientemente y se llamó SREBP-1c por su capacidad de unirse al elemento de respuesta a esteroides del promotor del gen del receptor de LDL (Yokoyama et al., 1993).

Aunque hay claras evidencias de que ADD1/SREBP1c se encuentra regulado por insulina y está involucrado en la regulación de genes asociados con la síntesis de colesterol y el metabolismo lipídico, hay estudios que indican que SREBP1c no es crítico para la adipogénesis ya que ratones deficientes en SREBP-1c no tienen una reducción significativa de tejido adiposo blanco (Shimano et al., 1997). Además, cuando se cruzaron ratones deficientes en SREBP-1c con ratones *ob/ob* se demostró que SREBP-1c no se requería para el desarrollo de obesidad (Yahagi et al., 2002). Sin embargo, la expresión ectópica de un dominante negativo SREBP-1c atenuó la diferenciación del adipocito (Kim and Spiegelman, 1996). Además, la sobreexpresión de SREBP-1c intensifica la actividad adipogénica de PPAR γ (Kim and Spiegelman, 1996), y otros estudios sugieren que

SREBP-1c contribuyen a la generación de ligandos de PPAR γ (Kim et al., 1998b). En resumen, estudios *in vitro* defienden un papel de SREBP-1 en adipogénesis, pero los estudios *in vivo* indican que SREBP-1c no se requiere para la producción o expansión del tejido adiposo.

Se ha visto además que la actividad de SREBP-1c por sí sola no estimula completamente los genes lipogénicos en respuesta a carbohidratos, porque la delección del gen en el ratón sólo se redujo en un 50% la síntesis de ácidos grasos (Liang et al., 2002), lo que evidencia que la insulina por sí sola no es capaz de inducir los genes lipogénicos, siendo necesario un regulador adicional.

Durante un tiempo se pensó que la insulina y el glucagón eran los únicos responsables en la regulación de genes lipogénicos, sin embargo a lo largo de estos últimos 20 años ha ido cogiendo más peso el hecho de que por sí sola la glucosa puede tener un gran efecto regulador a nivel transcripcional. Un claro ejemplo es la regulación del gen piruvato kinasa (L-PK) por glucosa, independiente de insulina en cultivos de hepatocitos expresando glukokinasa (Doiron et al., 1994) o el gen Spot14 en el cuál se describió por primera vez una región en el promotor implicada en la inducción transcripcional en alta concentración de glucosa, a la que se denominó elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE) (Shih and Towle, 1992). El factor de transcripción hepático capaz de unirse a la secuencia ChoRE del promotor LPK y promover su expresión en respuesta a glucosa, fue descrito por el grupo de Uyeda en 2001 denominándose ChREBP

ChREBP, al igual que SREBF1c, pertenece a la familia de los factores de transcripción con un dominio de unión a ADN en forma de bHLH/LZ. Es un factor de transcripción de 100 kDa aproximadamente y está altamente conservado, con un 82% de homología entre rata, ratón y humanos. Fue purificado por primera vez por el grupo de Uyeda en el año 2001 estudiando la regulación del gen L-PK (Yamashita et al., 2001).

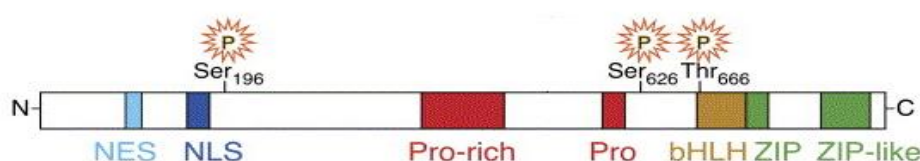


Figura 5. **Esquema adaptado de Uyeda et al 2006 de la estructura primaria de ChREBP.** Se muestran las regiones y dominios más significativos de su estructura. NES (señal de exportación nuclear), NLS (señal de localización nuclear), Pro (región rica en prolina), bHLH (dominio de unión al ADN), ZIP (cremallera de leucinas) y Ser 196, Ser626 y Thr666 (lugares de fosforilación).

El motivo por el cual este gen fue seleccionado, fue porque posee el elemento de respuesta a glucosa, el cual consiste en dos Cajas E (CACGGG y CCCGTG) separadas por 5 bases. ChREBP presenta una serie de dominios que son clave para ejercer su acción en respuesta a glucosa, según se indica en la figura 5.

ChREBP es un factor de transcripción citoplasmático que se transloca constitutivamente al núcleo, cuando la concentración de glucosa es alta. Uyeda y colaboradores propusieron un modelo de activación de éste factor de transcripción en respuesta a glucosa, en hepatocitos, por la defosforilación de las Serinas 196, 626 y treonina 666 (Kabashima et al., 2003; Kawaguchi et al., 2001). A baja concentración de glucosa, ChREBP se localiza en el citosol, ya que la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA) fosforila los dos residuos de serina 196 y 626 y el residuo de treonina. Cuando la concentración de glucosa aumenta, aumenta la glucosa-6-fosfato intracelular, acumulándose xilulosa-5-fosfato, intermediario de la vía de las pentosas, en el interior de la célula. La xilulosa acumulada, activa la fosfatasa 2A (PP2A) la cual desfosforila ChREBP, permitiendo la entrada de ChREBP activo al núcleo. Una vez dentro del núcleo, ChREBP interacciona con el factor X semejante a max ("Max-like factor X, Mlx) formando un heterodímero y uniéndose a los promotores de genes lipogénicos a través del elemento de unión a ChoRE (Ma et al., 2005) promoviendo la activación de la transcripción de éstos genes. Una vez ejercido su efecto transcripcional, la PKA fosforila ChREBP en los residuos Ser626 y Thr666 favoreciendo su translocación al citoplasma. En el citoplasma, ChREBP es fosforilado por PKA en Ser196 manteniéndolo en estado inactivo.

El papel de ChREBP en los hepatocitos, según el grupo de Uyeda, conecta la glicolisis con la lipogénesis (Uyeda and Repa, 2006). La activación de ChREBP incrementa por un lado la utilización de glucosa y por otro la formación de ácidos grasos y triacilglicerol a partir del exceso de azúcar, aumentando la expresión de las enzimas L-PK, ME, ACL, ACC y FAS. En la Figura 6 se muestra el papel de ChREBP en la glicolisis y lipogénesis adaptado de *Uyeda et al* 2006.

Como ocurrió con SREBP1c en los primeros años de su descubrimiento, los trabajos en ChREBP se han centrado sobre todo en hígado, siendo mínimos los artículos publicados en tejido adiposo o preadipocitos. Para estudiar la función fisiológica de ChREBP se han llevado a cabo varios estudios utilizando el modelo de ratón ChREBP^{-/-} (Iizuka et al., 2004). Cuando los ratones ChREBP^{-/-} fueron alimentados con una dieta normal, en comparación con el ratón salvaje, su grasa epididimal y tejido adiposo marrón se vieron reducidos. Además el nivel en sangre de glucosa y la cantidad de glucógeno almacenado aumentaron significativamente. Cuando a los animales se les sometió a una dieta rica en carbohidratos, el ratón ChREBP^{-/-} mostró unos niveles bajos de TG y de colesterol en plasma, en comparación al ratón control, además de una disminución de las enzimas responsables de la vía lipogénica.

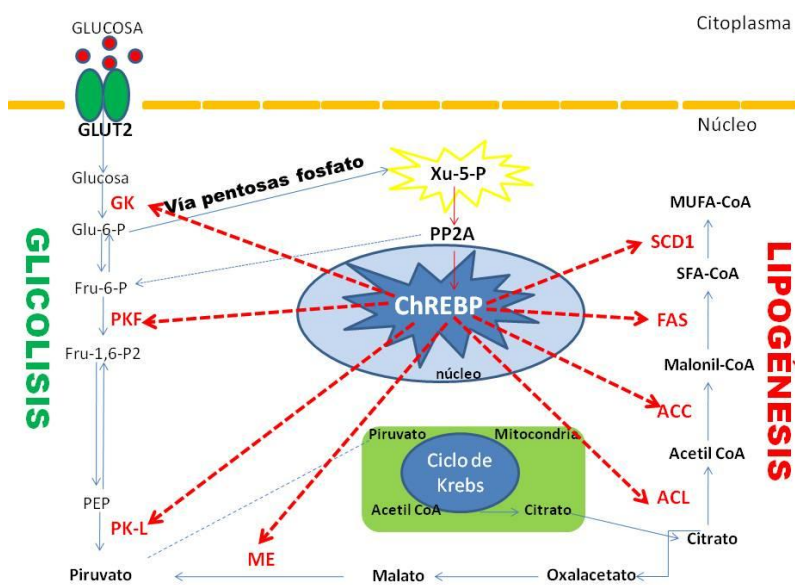


Figura 6. Función de ChREBP en la glicólisis y lipogénesis adaptado de Uyeda *et al* 2006

En otro estudio, se evaluó la función de ChREBP en un modelo para el estudio de la obesidad, resistencia insulínica y diabetes tipo 2, en el ratón *ob/ob*. El ratón *ob/ob*, sin ChREBP mostró una mejora en la esteatosis hepática con una disminución de ácidos grasos y TG en plasma y una mejora en la resistencia insulínica. El peso se redujo y la cantidad de tejido adiposo marrón también, cuando se comparó con el ratón *ob/ob* (Dentin *et al.*, 2006). Estos estudios evidencian que ChREBP juega un importante papel central en la lipogénesis *in vivo* y en el desarrollo de la obesidad y la resistencia insulínica.

En humanos recientemente se han encontrado además fuertes correlaciones que relacionan varios polimorfismos de nucleótido simple (SNP) con el nivel de TG y el riesgo de daño coronario (Kathiresan *et al.*, 2008a; Kathiresan *et al.*, 2008b; Kooner *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2009; Polgar *et al.*, 2010; Vrablik *et al.*, 2008).

Tanto los estudios en animales como los SNP encontrados en humanos sugieren que ChREBP puede contribuir activamente al desarrollo de la obesidad y es clave en el comienzo de la dislipidemia y la resistencia insulínica.

LIPOLISIS

La lipólisis, es la vía catabólica que permite la hidrólisis de TG almacenados en el adipocito en NEFA y glicerol. Con frecuencia se ha considerado este proceso como una vía metabólica simple y bien comprendida, sin embargo, su regulación es compleja y el buen funcionamiento de la misma asegura el mantenimiento de la homeostasis energética así como la prevención de ciertos desórdenes metabólicos.

Los principales factores en la regulación de la lipólisis en humanos son las catecolaminas, péptidos natriuréticos, la insulina y glucagón. Catecolaminas y péptidos natriuréticos regulan los procesos de lipólisis intracelular aumentando los niveles de AMPc y activando a lipasas que hidrolizan los TG acumulados en el interior de gotas lipídicas. La insulina inhibe el proceso anterior disminuyendo los niveles de AMPc y aumentando la actividad lipogénica celular. Existen además otros agentes lipolíticos y antilipolíticos, que han sido identificados en estudios *in vitro*, pero que todavía están por elucidar.

Durante la lipólisis los TG almacenados en el adipocito se hidrolizan por la acción principal de tres enzimas: desnutrina o fosfolipasa A2 ξ (ATGL), lipasa sensible a hormona (HSL) y la monoacilglicerol lipasa (MGL). El resultado de la hidrólisis es la formación de NEFA y glicerol que son transportados por el torrente sanguíneo al hígado (glicerol y NEFA) músculo esquelético y corazón (sólo NEFA). En humanos la tasa de renovación de los TG en el total de la masa del tejido adiposo, es de 100-300 g de TG por día (Lafontan and Langin, 2009). Un desequilibrio, entre hidrólisis y síntesis de TG puede ser una causa importante en el desarrollo de la obesidad.

Regulación de la lipólisis

La regulación de la lipólisis se centra principalmente en la superficie de la gota lipídica, bajo una fuerte regulación hormonal. Durante el ayuno, las catecolaminas se unen a receptores β -adrenérgicos acoplados a proteínas Gs. Hay varios tipos de receptores β -adrenérgicos, siendo los β 1 y β 2 los que presentan una mayor actividad en tejido adiposo humano, mientras que los β 3 son más activos en roedores (Barbe et al., 1996; Lonnqvist et al., 1995). Una vez que se unen a estos receptores se desencadena una cascada de señales que activa las adenilato ciclasas, las cuales incrementan los niveles de AMPc activando PKA. Ésta fosforila HSL provocando la translocación desde el citoplasma a la gota lipídica. En ratones deficientes en HSL se observó que no son los TG los que se acumulan en los tejidos, sino los diglicéridos (Haemmerle et al., 2002), por lo que se sugirió que debería haber otra lipasa adicional que sería responsable de la hidrólisis de TG. Así, en 2004, varios grupos descubrieron al mismo tiempo una nueva lipasa a la que denominaron lipasa de TG de adipocitos ATGL (Jenkins et al., 2004; Villena et al., 2004; Zimmermann et al., 2004). Además, existe otra lipasa, MGL, que es la responsable de la hidrólisis de monoglicéridos a ácidos grasos y glicerol (Fredrikson et al., 1986). La PKA también fosforila la proteína asociada con la gota lipídica, la perilipina, la cual permite la hidrólisis de los TG a través de ATGL (Brasaemle, 2007; Granneman and Moore, 2008). Durante los periodos de ayuno los glucocorticoides se encuentran elevados, lo que permite una mayor transcripción de ATGL, favoreciendo la lipólisis.

Tras la ingesta se inhibe la lipólisis debido a la acción que ejerce la insulina. Ésta fosforila fosfodiesterasa 3B, la cual disminuye al AMPc y a su vez la PKA, causando una reducción de la lipólisis.

Otras señales reguladoras incluyen la acción de citoquinas, hormonas de crecimiento, ácido nítrico o péptidos natriuréticos, sin embargo es necesario un mayor estudio de estas vías para conocer su capacidad reguladora de una forma más precisa (Ahmadian et al., 2009).

1.5. APLICACIÓN DE MICROARRAYS DE ADN EN EL ESTUDIO DE LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad compleja en la que el estudio de expresión de miles de genes o proteínas, puede ser decisivo en la identificación de vías y procesos alterados e implicados dentro de su contexto biológico. Durante la última década, el desarrollo de la bioinformática y de técnicas de alto rendimiento para el análisis de la expresión de miles de genes o proteínas ha sido el artífice de la transformación de la biología molecular en los últimos años. Actualmente, el estudio de los procesos biológicos ha pasado de centrarse en el estudio individualizado de las funciones biológicas de unos pocos genes o proteínas, a una investigación con un enfoque más global del problema biológico. Las técnicas de genómica funcional no sólo se centran en la identificación de la función de los genes y sus productos, sino además, en conocer como éstos interaccionan durante el desarrollo de distintos procesos normales o patológicos; por lo tanto, parecen apropiados para el estudio de enfermedades poligénicas (Glazier et al., 2002). En los últimos años, se han multiplicado el número de trabajos que aplican estas técnicas al estudio de enfermedades complejas como, cáncer, hipertensión, inflamación, artritis reumatoide, cirrosis, resistencia insulínica, diabetes tipo 2 y obesidad (Kim and Park, 2010).

El primer estudio llevado a cabo usando microarrays de oligonucleótidos fue publicado en el año 2000 por Soukas *et al.*, con aproximadamente 6500 genes murinos en tejido adiposo de ratones *ob/ob*, salvajes y transgénicos con baja glucosa (Soukas et al., 2000). En humanos, también en el año 2000, se publicó el primer trabajo con microarrays, pero sólo se utilizó tejido adiposo SC de pacientes delgados con 18000 EST (expressed sequence tag) (Gabrielsson et al., 2000). Este estudio permitió la identificación de numerosos genes cuya expresión se desconocía previamente en tejido adiposo y puso de manifiesto la poderosa herramienta que suponía el uso de microarrays de ADN en la búsqueda de nuevas vías reguladoras en el tejido adiposo. A partir de este estudio se han publicado numerosos trabajos de los cuales se obtuvieron una gran información del perfil de expresión en distintos tejidos como tejido adiposo, hígado, hipotálamo, músculo esquelético y riñones, de animales o sujetos obesos.

Centrándonos en estudios de microarrays de tejido adiposo humano, son muchos los trabajos publicados en los 10 últimos años. Sin embargo todos ellos se trata de estudios parciales, en los que utilizan un solo tipo de tejido (OM o SC) o un único grupo de individuos (obesos o delgados pero no ambos) o no incluyen el genoma completo en el array. Estos estudios se muestran en la tabla 3 donde además mostramos el más completo hasta el momento que es el que se presenta como objetivo de esta tesis.

La obesidad debe entenderse como una enfermedad compleja, en la que el estudio de expresión de miles de genes o proteínas, podría ser decisivo en la identificación de vías y procesos alterados e implicados dentro de su contexto biológico.

Pacientes	Sexo	Localización	Plataforma	Autores
Delgados (n=4)	Hombres Mujeres	SC	<i>ADN array containing over 18,000 human expressed sequence-tagged (EST) clones</i>	(Gabrielsson et al., 2000)
Obesos (n=10)	Hombres	OM SC	<i>Human Genome U95A Affymetrix Gene Chip Expression Analysis</i>	(Gabrielsson et al., 2002)
Obesos (n=10)	Hombres	SC OM	<i>Human Genome U95A Affymetrix Gene Chip Expression Analysis</i>	(Gabrielsson et al., 2003)
Obesos (n=10)	Hombres	OM SC	<i>Affymetrix human U133A arrays</i>	(Vohl et al., 2004)
Obesos y delgados (n=6)	Hombres	OM	<i>Chip. ADN Microarray System (Mergen Ltd.)1152</i>	(Gomez-Ambrosi et al., 2004)
Obesos (n=50) Delgados (n=9)	Hombres Mujeres	OM	<i>40.173 clones (EST)</i>	(Baranova et al., 2005)
Obesos (n=10)	Hombres	SC OM	<i>Affymetrix human U133A microarrays</i>	(Zhang et al., 2007)
Obesos (n=15) Delgados (n=10)	Hombres Mujeres	SC	<i>319 genes Array diseñado</i>	(Rodriguez-Acebes et al., 2010)
Obesos (n=43) Delgado (n=4)	Hombres Mujeres	OM SC	<i>“Human Genome Survey Microarray V2.0” contiene 32,878 sondas correspondientes a 29,098 genes”</i>	(Hurtado Del Pozo et al., 2011)

Tabla.3. Estudios de microarrays en tejido adiposo humano

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue realizar un análisis comparativo del patrón de expresión génica entre tejido adiposo OM y SC de pacientes obesos mórbidos frente a pacientes controles y delgados mediante el uso de microarrays de ADN pues hasta ese momento sólo existían trabajos parciales.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. Identificar un gen referencia adecuado que nos permitiera una correcta interpretación de los resultados en los análisis de expresión génica en tejido adiposo humano, y que sirviera tanto para tejido adiposo procedente de distintas localizaciones (SC y OM) como para cultivo primarios *in vitro* de preadipocitos.
2. Analizar el efecto de la obesidad en el perfil de expresión de tejido adiposo SC y OM de pacientes obesos mórbidos en comparación con pacientes delgados e interpretar el conjunto de genes alterados dentro de un contexto biológico.
3. Dada la gran importancia de la regulación del metabolismo lipídico en el balance energético, validar genes involucrados en las vías de lipogénesis y lipólisis, y en mecanismos moleculares que regulan el balance energético, tales como enzimas, factores de transcripción o proteínas señalizadoras.
4. Determinar los niveles de expresión del factor de transcripción ChREBP, uno de los principales reguladores de la lipogénesis, en hígado y tejido adiposo humano de pacientes con obesidad y normopeso, así como de preadipocitos diferenciados procedentes de individuos obesos.

3. RESULTADOS

IPO8 y FBXL10 son buenos genes referencia en estudios de expresión génica en tejido adiposo SC y OM así como en preadipocitos humanos

Un factor determinante en el análisis de la expresión génica por PCR a tiempo Real (RT-PCR) es la elección de un buen gen referencia que permita una adecuada normalización de los resultados en la cuantificación de la expresión. Los genes denominados endógenos o genes referencia son genes que se expresan constitutivamente en todos los tejidos, y cuya actividad es esencial en el mantenimiento de la función celular (Butte et al., 2001). Sin embargo, se ha visto que genes comúnmente utilizados como genes referencia varían su expresión en distintos tejidos o condiciones experimentales (Bustin, 2000; Kouadjo et al., 2007; Lee et al., 2002; Suzuki et al., 2000), y específicamente esos genes también varían en tejido adiposo (Barroso et al., 1999; Catalan et al., 2007; Gabrielsson et al., 2005; Gorzelnia et al., 2001). En esta parte de la tesis se ha desarrollado el objetivo 1 planteado con anterioridad.

Para ello, usamos microarrays de ADN como herramienta, identificando genes estables tras realizar un filtrado en los datos de expresión diferencial entre pacientes obesos y delgados en tejido adiposo SC y OM. Se obtuvo como gen más estable la proteína nuclear FBXL10 (F-box and leucine-rich repeat protein-10).

Además, se evaluaron 16 genes controles o referencia utilizados normalmente en la bibliografía mediante tres métodos estadísticos: coeficiente de variación (CV), geNorm y Normfinder. El estudio de la expresión de dichos genes se realizó en muestras de tejido adiposo OM y SC de pacientes obesos y delgados mediante el uso de tarjetas microfluídicas y mostró que la proteína Importina 8 (IPO8) era el gen más estable considerando los tres métodos estadísticos. Para confirmar la validez de estos dos genes durante la adipogénesis *in vitro*, los dos candidatos de cada uno de los análisis, tanto del array como de las tarjetas microfluídicas, fueron evaluados en cultivos de preadipocitos humanos en distintos días de diferenciación así como bajo ciertos tratamientos hormonales. FBXL10 e IPO8 no variaron su expresión en ninguna de las condiciones elegidas por lo que pueden considerarse buenos candidatos para ser usados como genes referencia tanto en tejido adiposo OM y SC como en cultivos de preadipocitos humanos.

Trabajo publicado en *Obesity*. 18:897-903 (2010)

IPO8 and *FBXL10*: New Reference Genes for Gene Expression Studies in Human Adipose Tissue

Carmen Hurtado del Pozo^{1,2}, Rosa M. Calvo^{1,2}, Gregorio Vesperinas-García³, Javier Gómez-Ambrosi^{2,4}, Gema Frühbeck^{2,4}, Ramón Corripio-Sánchez³, Miguel A. Rubio⁵ and Maria-Jesus Obregon^{1,2}

Housekeeping genes frequently used in gene expression studies are highly regulated in human adipose tissue. To ensure a correct interpretation of results, it is critical to select appropriate reference genes. Subcutaneous (SC) and omental (OM) adipose tissue expression was analyzed from lean and obese subjects using whole genome complementary DNA (cDNA) microarrays to identify stably expressed genes and commercial TaqMan low density arrays (LDAs), with 16 common control genes. The best candidate gene from microarrays analysis was F-box and leucine-rich repeat protein-10 (*FBXL10*) (fold-change 10^{-3} $P < 0.01$), an ubiquitous nucleolar protein evolutionarily conserved. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) and importin 8 (*IPO8*), were the best reference genes among the 16 genes in the LDAs with coefficient of variation (CV) of 4.51 and 4.55%, respectively. However, when the LDAs data were further analyzed by the geNorm and NormFinder softwares, *IPO8*, a nuclear protein mediating import of proteins, was the first and the third better reference gene, respectively. *IPO8* and *FBXL10* were further validated by real-time PCR in additional OM and SC fat samples and primary cultured preadipocytes. According to their CV, *IPO8* resulted more suitable than *FBXL10* in both adipose tissue depots and SC preadipocytes, whereas *FBXL10* performed better than *IPO8* in OM cultured preadipocytes. Both genes expression levels did not change throughout adipogenesis. Thus, we provide clear evidence that *IPO8* and *FBXL10* are good candidates to use as reference genes in gene expression studies in human OM and SC adipose tissues as well as differentiated primary preadipocytes.

Obesity (2010) **18**, 897–903. doi:10.1038/oby.2009.374

INTRODUCTION

Endogenous or reference genes are those that are constitutively expressed in all tissues and have an essential role in the maintenance of the cellular function (1). In line with this role, it is generally assumed that their expression levels are similar in different conditions or cell types. However, it has been shown that genes usually considered as reference genes exhibit large variations in different tissues or experimental conditions (2–5).

Regarding the adipose tissue, a highly regulated and complex organ, the bibliography describes as housekeeping genes some that are regulated under hormonal stimulation or during adipogenic differentiation. That is the case of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), β -actin (*ACTB*) or 18S ribosomal RNA (18S) (6–9). It seems fundamental to choose a good control gene in order to allow an adequate analysis of gene expression studies. When working with a single tissue or cell type, this is solved using a gene whose expression levels

remain constant in those specific samples; however, in human adipose tissue, the expression of genes is different depending on their anatomical location (subcutaneous (SC) or omental (OM)). As OM adipose tissue differs considerably from the SC depot, physiological and gene expression differences have been reported between both localizations (10–12).

The aim of this study was to find the most suitable reference gene for gene expression studies in human adipose tissues and primary cultures of preadipocytes, using microarrays and statistical methods. For this purpose, we evaluated the variation in gene expression level in SC and OM adipose samples from lean and obese subjects using TaqMan endogenous control arrays low density arrays (LDAs), which contain 16 control genes normally used in the literature as endogenous genes, and to compare the results with stable genes obtained from microarrays. Though microarrays are commonly applied to find genes with differential expression across experimental conditions,

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM, CSIC-UAM), Madrid, Spain; ²CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) ISCIII, Madrid, Spain; ³Servicio de Cirugía, Hospital "La Paz," Madrid, Spain; ⁴Metabolic Research laboratory, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; ⁵Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Clínico S. Carlos, Madrid, Spain. Correspondence: Rosa M. Calvo (rmcalvo@iibm.uam.es) or Maria J. Obregon (mjobregon@iibm.uam.es)

Received 10 March 2009; accepted 22 September 2009; published online 29 October 2009. doi:10.1038/oby.2009.374

ARTICLES

ADIPOCYTE BIOLOGY

the data may also be used to identify stably expressed genes (5). Different stability algorithms have been used with microarray data, in order to select candidate genes based on the fold expression changes (13,14), variance of expression (15) or integrative correlations (16). The statistical methods used in our study were geNorm, NormFinder and analysis of coefficient of variance (%CV).

In this study we show that importin 8 (*IPO8*) and *FBXL10* are two previously unidentified genes, which are good control genes for expression studies involving human isolated differentiated preadipocytes and whole adipose tissue.

METHODS AND PROCEDURES

Subjects

Human adipose tissue was obtained from the OM and SC depots from 45 obese patients, 20 males and 25 females, undergoing bariatric surgery. Five of these patients were diabetic. OM and SC adipose tissue from four lean (3 males and 1 female) subjects were also obtained by Nissen fundoplication. The samples were immediately frozen and stored at -80°C until processed. Surgeries were performed at the Hospital Universitario La Paz (Madrid), Hospital Clínico S. Carlos (Madrid) and Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona). Patients were classified as obese or lean according to their BMI, calculated as the ratio between the weight in kilograms and the square of the height in meters. Obese patients were 40.4 ± 1.7 years old and showed a BMI of $49.7 \pm 1.1 \text{ kg/m}^2$ (mean \pm s.e.m.) whereas lean subjects were 47.5 ± 7.1 years old and presented a BMI of $23.8 \pm 0.3 \text{ kg/m}^2$. Basal glucose, triglycerides, and total cholesterol concentrations in plasma were $114 \pm 6 \text{ mg/dl}$, $139 \pm 19 \text{ mg/dl}$, and $182 \pm 5 \text{ mg/dl}$ in obese patients, respectively, whereas the respective concentrations of lean patients were 91 ± 1 , 71 ± 12 , and $197 \pm 13 \text{ mg/dl}$. Although glucose and triglycerides were significantly different between both groups ($P < 0.05$), variables were within the normal range. All subjects gave informed consent. The protocols were approved by the Ethical Committees of the Hospitals and our institution, and are in agreement with the European laws on biomedical research and with the principles of the Declaration of Helsinki.

Primary cultures of human OM preadipocytes

Human adipose tissue was obtained from the abdominal OM and SC regions from eight additional obese patients (7 women and 1 men) undergoing bariatric surgery. Patients with a mean age of 43.9 ± 4.1 years, showed a BMI of $49.3 \pm 2.2 \text{ kg/m}^2$, with no other pathologies. The protocol followed the ethical considerations as above.

Preadipocytes were isolated and differentiated under defined adipogenic conditions (17). After a 10 days differentiation period, cells were treated for 48 h with 10% depleted serum in presence or absence of insulin (3 nmol/l), and treated (or not) with 2 nmol/l triiodothyronine, rosiglitazone (1 $\mu\text{mol/l}$), dexamethasone (100 nmol/l), hydrocortisone (100 nmol/l), or norepinephrine (5 $\mu\text{mol/l}$) during the last 24 h. Cells were harvested at day 12 of differentiation. Depleted serum was obtained as follows: first, hypothyroid serum was obtained by depleting heat-inactivated fetal bovine serum of thyroid hormones with the anion exchange resin AG1-X8 as described (18). Depleted serum was obtained by treatment of hypothyroid serum with charcoal overnight (20 mg charcoal/ml serum). This treatment further depleted serum from the remaining thyroid hormones and other hormones such as insulin and glucocorticoids. After harvesting the cells, total RNA was extracted.

In differentiation experiments, cells were just differentiated without any further treatment and harvested at 0, 6, and 12 days.

RNA extraction

Approximately 100 mg of each adipose sample was used to extract RNA with the RNeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN, Madrid, Spain)

following the protocol provided by the manufacturer. RNA integrity and concentration were checked by the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Microarrays

Human Genome Survey Microarray version 2.0 from Applied Biosystems (Foster City, CA) contains 60-mer oligonucleotides specific for 32,878 probes corresponding to 29,098 genes. The data set includes genes from both public databases (RefSeqs, GenBank and Mammalian Gene Collection) and the Celera Genomics database (Rockville, MD). Ten arrays were utilized for OM adipose tissue and 14 for SC adipose tissue from men and women. Total RNA samples obtained from 12 obese and four lean subjects were amplified into digoxigenin labeled cRNA using Applied Biosystem Chemiluminescent RT-ITV Labeling KIT according to the manufacturer's directions. The amplified and labeled cRNA was injected into each microarray hybridization chamber and hybridized at 55°C for 16 h. Detection at 458 nm was performed with the Chemiluminescent Detection kit (Applied Biosystems) and image acquisition was carried out using the 1,700 Chemiluminescent Microarray Analyzer.

Arrays data were read, preprocessed and filtered according to the platform manufacturer's recommendation with the Applied Biosystems software. For Applied Biosystems Expression Arrays, an excellent signal detection is set as signal to noise >3 and quality flag $<5,000$. Thus, probes having a signal to noise ratio <3 and a Flag value above 5,000 in all samples were discarded. After filtering, 14,564 genes in the OM depot and 19,183 genes in the SC depot from the original 29,098 genes were obtained. Before being compiled into an expression profile data matrix, all arrays were quantile-normalized to be comparable because this method ensures that the intensities have the same empirical distribution across arrays. Genes differentially expressed were selected by using the LIMMA package (19) from the Bioconductor project (<http://www.bioconductor.org>) (20) contained in the Spotfire Integromics software. The statistical analysis described above was performed by Integromics (Granada, Spain). Among the rest of the genes not differentially expressed, we selected as stable those genes which in both depots showed a fold-change <0.01 .

TaqMan Low Density Endogenous Control Panel microfluidic cards

To validate the variation in gene expression levels of various commonly used endogenous controls, a TaqMan Low Density Endogenous Control Panel was used (Applied Biosystems). This microfluidic card (or LDA) contains 16 human TaqMan Gene Expression Assays (Table 1). Each LDA has a three well replicate for each assay, and eight ports for loading of complementary DNA (cDNA) and TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) in a final volume of 100 μl . The 384-well micro fluid cards were run in the following PCR program: 50°C for 2 min, 94°C for 10 min, and 40 cycles of 97°C for 30 s followed by 60°C for 1 min. To measure RNA quantity (threshold cycle (C_t)), samples were monitored by the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System.

OM and SC adipose tissues from four obese and four lean subjects were used. Fifty nanograms of each RNA were reversed-transcribed with the high-capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Each sample was loaded in one of the eight ports of the microfluidic cards, analyzed in triplicates obtaining an average C_t and the coefficient of variation (CV). This CV equals the standard deviation divided by the mean C_t (expressed as percentage) and was used to compare the variation degree among the 16 control genes. In addition to CV analysis, geNorm Visual Basic (21) and NormFinder applications for Microsoft Excel (15) were used to confirm results. Each of these methods generates a measure of reference gene stability, which can be used to rank the reference genes in order of stability. Both softwares generate a stability value of which a lower value indicates increased stability in gene expression.

ARTICLES

ADIPOCYTE BIOLOGY

TaqMan RT-PCR

A further analysis was performed with conventional TaqMan reverse-transcription PCR (RT-PCR), using predesigned TaqMan Assays on demand (Applied Biosystems) for *IPO8*, 18S, F-box and leucine-rich repeat protein-10 (*FBXL10*), leptin, interleukin 6, and adiponectin. For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse transcribed in a 20 µl final volume using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were performed on a 7300 real-time PCR System (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm s.e. of the mean (s.e.m.). Significance of differences between two groups is shown, and it was measured by Student's *t*-test. Statistical analysis of microarrays and LDAs have been explained in the corresponding sections.

RESULTS**Microarray gene expression analysis**

A whole genome microarray assay analysis from a group of human adipose tissue (OM and SC adipose tissue from 4 lean and 12 obese subjects) (C. Hurtado del Pozo, R.M. Calvo, M.J. Obregon *et al.*, unpublished data) identified genes with a moderate abundance, which were consistently expressed in all the samples across the study. Among them, those with a fold-change <0.01 in both, OM and SC depots were chosen. From 29,098 genes analyzed, 44 and 58% of the OM and SC genes, respectively, were expressed with a good signal quality. Among these, 42 genes were found in OM adipose tissue and 248 genes in SC fat tissue with a stable expression, exhibiting at least a $P < 0.01$.

After comparing stably expressed genes from both depots, only two genes were common to OM and SC localizations, *FBXL10*, and *FTCD*. *FBXL10* is a nucleolar protein that belongs to the JHDM family (JmjC-domain-containing histone demethylase), whereas *FTCD* (Forminotransferase-cyclo deaminase) is a bifunctional enzyme, a metabolic intermediate between the catabolism of histidine and that of folate. Considering the features of both proteins, we proposed *FBXL10* as the most adequate as a control gene to perform further analyses, because it is an ubiquitous protein that is conserved evolutionarily and regulates transcription of ribosomal genes (18S, 5S, 8S, and 28S), which are essential for the maintenance of cell functions.

TaqMan LDAs

To look for possible endogenous controls for gene expression in human adipose tissue, we used predesigned TaqMan LDAs with a panel of 16 human genes that are commonly used as endogenous controls (cat. no. 4367563, Applied Biosystems). The genes are shown in **Table 1**.

cDNA from 16 different samples of adipose tissue (four OM from lean, four OM from obese, four SC from lean, and four SC from obese individuals) were run down all channels of two identical microfluidic cards with 16 endogenous genes. The data obtained were virtually identical with a correlation coefficient of 0.989, which shows that variability of gene expression between microfluidic cards is negligible.

Two samples from obese patients of each depot were run in triplicates in the four channels of each microfluidic card with

Table 1 Ranking of 16 commonly used housekeeping genes in OM and SC adipose tissue samples from obese and lean subjects, based on their %CV

Symbol	OM + SC				SC		OM	
	Mean C_t	SD	CV (%)	Rank	CV (%)	Rank	CV (%)	Rank
<i>HPRT1</i>	30.36	1.37	4.51	1	3.83	1	4.83	6
<i>IPO8</i>	28.74	1.31	4.55	2	4.72	2	4.57	5
<i>HMBS</i>	31.81	1.53	4.80	3	5.25	3	4.38	3
<i>TFRC</i>	28.87	1.39	4.81	4	5.32	4	4.46	4
<i>POLR2A</i>	27.97	1.37	4.90	5	6.13	7	3.71	1
<i>YWHAZ</i>	31.18	1.58	5.07	6	6.09	6	4.24	2
<i>B2M</i>	23.59	1.31	5.55	7	5.39	5	5.71	10
<i>PKG</i>	26.17	1.54	5.88	8	6.34	9	5.66	9
<i>GUSB</i>	29.07	1.72	5.91	9	6.56	10	5.56	8
<i>PPIA</i>	24.85	1.48	5.95	10	6.70	11	5.45	7
<i>TBP</i>	31.02	1.93	6.22	11	6.23	8	6.62	12
<i>UBC</i>	24.71	1.72	6.94	12	8.07	14	5.74	11
<i>GADPH</i>	26.10	1.84	7.06	13	7.59	13	6.90	13
<i>ACTB</i>	23.72	1.93	8.12	14	8.68	15	7.96	14
<i>RPLP0</i>	25.28	2.19	8.65	15	6.88	12	10.03	15
18S	13.42	1.84	13.70	16	15.65	16	11.52	16

ACTB, β -Actin; *B2M*, β -2-microglobulin; CV, coefficient of variation; *GADPH*, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GUSB*, β -Glucuronidase; *HMBS*, Hydroxymethylbilane synthase; *HPRT1*, Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1; *IPO8*, importin 8; OM, omental; *PKG*, Phosphoglycerate kinase; *POLR2A*, RNA Polymerase II; *PPIA*, Peptidylprolyl isomerase A; *RPLP0*, Ribosomal large P0; SC, subcutaneous; *TBP*, TATA binding protein; *TFRC*, Transferrin receptor; *UBC*, Ubiquitin C; *YWHAZ*, Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-monooxygenase activation protein; 18S, 18S Ribosomal RNA.

ARTICLES

ADIPOCYTE BIOLOGY

the 16 control genes and compared to another card, in which two samples from lean OM and SC tissue were loaded. Except for 18S with the highest expression, the other genes exhibited C_t s ranging from 23 to 32 cycles. Mean C_t values for *FBXL10* (the most stable gene from microarrays) in OM and SC adipose tissue samples were 31.34 ± 0.32 and 31.96 ± 0.34 , respectively.

The data showed a low %CV between wells. Data are shown in Table 1.

Taking OM and SC samples as a whole, the control genes with the most stable expression were hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) and *IPO8*, whereas the genes with high variation in the expression levels were 18S, ribosomal large P0 (*RPLP0*), *ACTB*, and *GAPDH*, which are widely used as reference genes. When analyzing individually OM and SC tissues, *HPRT1* was not as suitable as *IPO8* in OM tissue, thus we decided to perform a further evaluation of stability. For this purpose, we analyzed the results from the LDAs with two powerful previously published Microsoft Excel-based softwares: the geNorm and the NormFinder programs. Both are available freely on internet sites (<http://medgen.ugent.be/genorm> and <http://www.mdl.dk>). geNorm determines the most stable reference genes from a set of tested genes within a panel, and calculates a gene expression normalization factor for each tissue sample based on the geometric mean of a user defined number of reference genes (21). From geNorm results (Figure 1, upper panel), *HPRT1* resulted to have the third highest M value whereas the two genes with the lowest M value were peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) and *IPO8*, confirming that *IPO8* is very suitable as a reference gene in adipose tissue. When NormFinder program was used with the 16 reference genes (Figure 1, lower panel), *RPLP0* and *GAPDH* resulted the first and second genes in the ranking, while *IPO8* turned out to be the third more suitable gene. Considering the results from the three analysis used (%CV, geNorm, and NormFinder), *IPO8* was the most suitable gene because its rankings were consistent with the three methods: 1st (geNorm), 2nd (%CV), and 3rd (NormFinder), despite some discrepancies with other genes. Although *GAPDH* with NormFinder resulted the second best gene, we think it is not suitable because its %CV was 7.06% (Rank 13) and in addition, as said in the introduction section, it is well described as a gene whose expression varies in different conditions in adipocytes. In a similar way, *RPLP0* was ranked as 1st by NormFinder and 2nd by geNorm, however, it was ranked the last but one gene (Rank 15) by the %CV method. In addition, there are concerns about using ribosomal protein genes as reference.

The following step was to check in 30 subjects using both adipose localizations, the stability of *IPO8* (the most suitable gene from LDA) versus 18S (the most used in the literature), and versus *FBXL10* (the most stable gene from our microarray data) by real-time RT-PCR. When CVs were compared, the 18S showed a CV of 17.1%, whereas the CV of *FBXL10* and *IPO8* were 3.61 and 3.04%, respectively.

In order to further evaluate the reference gene stability on a gene whose expression is well known to be elevated in obese patients, leptin was normalized to 18S, *IPO8*, or *FBXL10*

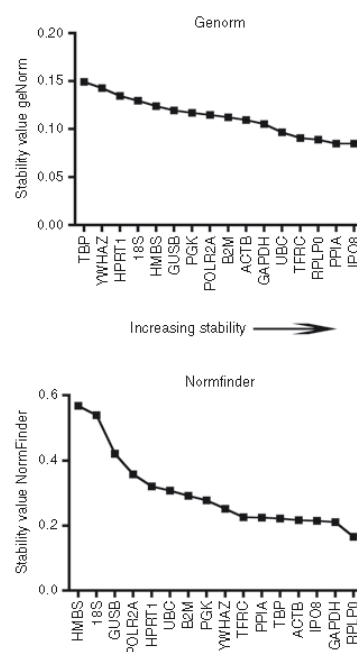


Figure 1 Reference gene stability measurements. The geNorm and NormFinder softwares were used to calculate the most stable genes among the 16 genes included in the TaqMan low density human endogenous control panel. RNA samples of omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese patients were used. The most stable genes are those with the lower values of stability.

(Figure 2a,b). Figure 2 shows that only normalization with *IPO8*, but not with 18S or *FBXL10*, reflected the normal increase in leptin expression in both OM and SC depots. Other genes such as adiponectin and interleukin 6 were studied in the same samples. Adiponectin expression in OM samples showed a tendency to decrease with all reference genes, but only was significant with 18S, and almost with *IPO8* ($P = 0.05$) (Figure 2c). In SC adipose tissue, adiponectin showed the opposite pattern with the three reference genes, but changes only were significant with *IPO8* (Figure 2d). Interleukin 6 increased significantly in OM adipose tissue only when it was normalized with *IPO8* (150-fold change) or *FBXL10* (76-fold change) (Figure 2e), whereas no changes were observed in SC samples with any of the reference genes (Figure 2f).

To further investigate the role of *IPO8* and *FBXL10* as reference genes, we decided to check it in primary cultures of human OM and SC adipocytes submitted to different treatments, in absence or presence of insulin, triiodothyronine, norepinephrine, dexamethasone, hydrocortisone, and rosiglitazone. The expression of both *FBXL10* and *IPO8* was not changed by the different treatments. Although both genes presented a good CV in these cultured adipocytes, *FBXL10* exhibited a slightly better and lower CV than *IPO8* (0.85% vs. 0.95%) in the adipocytes from the OM depot, whereas *IPO8* showed better CV than *FBXL10* in those adipocytes from SC origin (2.15% vs. 3.05%, respectively).

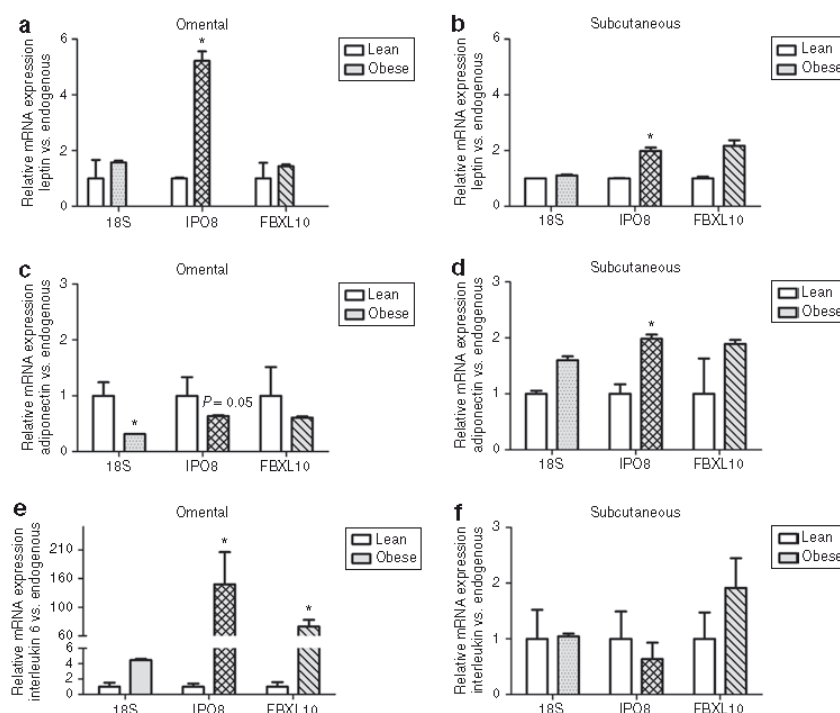
ARTICLES
ADIPOCYTE BIOLOGY

Figure 2 Effects of normalization by three reference genes (18S, IPO8, and FBXL10) on leptin (a,b), adiponectin (c,d), and interleukin 6 (e,f) mRNA expression in omental and subcutaneous adipose tissue of obese ($n = 33$) and lean subjects ($n = 4$). Data are mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$.

We further analyzed the *IPO8* and *FBXL10* expression at different days of differentiation (0, 6, and 12 days) of OM and SC cultured preadipocytes to study if these transcripts are modulated through adipogenesis. When data from differentiation experiments were taken as a whole, the %CV were 3.0 and 3.2% for *FBXL10* and *IPO8*, respectively in OM adipocytes. *GAPDH* was also measured showing a higher CV of 6.3%. In SC differentiated preadipocytes *FBXL10*, *IPO8*, and *GAPDH* showed a CV of 2.51, 2.54, and 6.73%, respectively. The levels of expression of the three genes obtained from each differentiation day in adipocytes from both depots appear in Figure 3. As seen, no variations of C_t were observed for *FBXL10* and *IPO8*, in contrast to *GAPDH* that showed significant changes along differentiation. Due to the exponential nature of this technique, each cycle (C_t) difference implicates a twofold change in the real mRNA levels. The lack of variations of *FBXL10* and *IPO8* transcripts throughout differentiation reinforces their use as reference genes in this type of cultures of adipose cells, in contrast to *GAPDH* mRNA changes.

Adipocyte differentiation was checked by visual inspection of the cells which accumulated lipids progressively and by measuring the mRNA levels of leptin and *aP2* (fatty acid-binding protein 4), two well known markers for late adipogenesis. The relative fold-change of leptin mRNA increased from 1.0 ± 0.2 at day 0, to 1.8 ± 0.10 at day 6 and 11.9 ± 4.5 at day 12 ($P < 0.05$ vs. day 0) in the OM adipocytes, and from

1 ± 0.5 (day 0) to 2.1 ± 0.6 (day 6) and to 7.0 ± 0.4 (day 12, $P < 0.05$ vs. day 0) in adipocytes from SC origin. Changes at day 6 were not significant. The relative fold-change of *aP2* was 1 ± 0.3 , 2158.0 ± 349.7 , 392.4 ± 119.3 at 0, 6, and 12 days in OM adipocytes, respectively, and 1 ± 0.35 , 4799.5 ± 750.7 , and 3283.1 ± 532.4 at the same times in SC cells. All changes in the *aP2* transcript were significant ($P < 0.01$) when compared to their respective day 0.

DISCUSSION

A determinant factor in the analysis of gene expression by quantitative RT-PCR is the election of a good control gene to ensure an adequate normalization of the results in the quantification of the expression. Although the scientific literature normally refers to housekeeping genes as synonyms of reference or control genes, these terms should not be indistinctly used, as many housekeeping genes vary greatly with different experimental or pathophysiological conditions.

In fact, our work shows that genes commonly used in these types of studies vary significantly in both depots of adipose tissue in lean and obese individuals.

The adipose tissue is not considered any more as a mere deposit of fat, but an organ with an essential endocrine role. The molecular mechanisms causing the hyperplasia or hypertrophy of this tissue have not fully identified, thus studies on gene expression can help to better understand the processes leading to obesity.

ARTICLES

ADIPOCYTE BIOLOGY

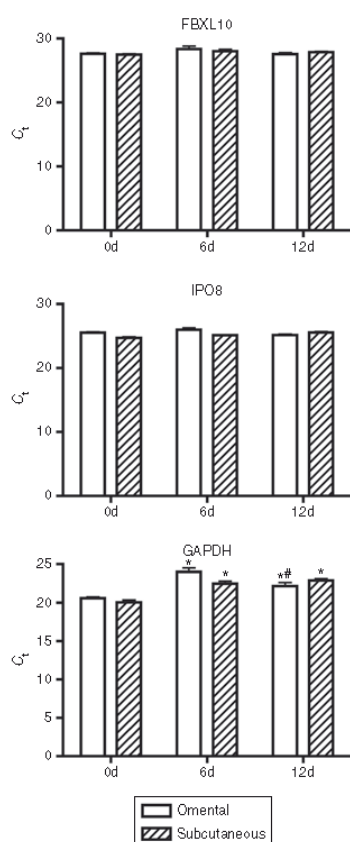


Figure 3 mRNA levels (expressed as mean $C_t \pm$ s.e.m.) of *FBXL10* (upper panel), *IPO8* (middle panel), and *GAPDH* (lower panel) in omental and subcutaneous human preadipocytes at different days of differentiation (0, 6, and 12 days). * $P < 0.05$ vs. its respective 0 day, # $P < 0.05$ vs. its respective 6 day. Data are from three independent experiments from each depot.

ACTB, *GAPDH*, and *18S* are the most commonly used genes to correct loading in gene expression studies (2,22,23). However, the present study shows they are the least stable genes studied, considering both depots, from the 16 ones used in the commercial microfluidic cards, as their CV were above the 5% level. Although there are controversial results regarding the *18S* in adipose tissue (8,24) a drawback to its use as a control gene is the considerable imbalance between mRNA and rRNA fractions (25) with different polymerases involved in their transcription (26). Ribosomal expression is altered in some experimental conditions (27) and under certain biological factors and drugs (28,29). In addition, *18S* shows resistance to degradation as compared to mRNAs (21). As *18S* has no introns, an additional error appears if DNase treatment of the samples fails or is incomplete.

ACTB and *GAPDH* have been used extensively as single control genes (2). In adipose tissue *ACTB* is regulated by hypocaloric diets (30) whereas *GAPDH* is very sensitive to any perturbation in cellular homeostasis and experimental

manipulation (2,31,32), as our results demonstrate in differentiation experiments.

RT-PCR, geNorm, and NormFinder programs were used to find the most suitable gene of a panel of 16 human genes that are commonly used as endogenous controls both in OM and SC adipose tissues. The most suitable gene was *IPO8*, which resulted the best choice using the three methods. At present, there are some statistical methods like geNorm, NormFinder, or Global Pattern Recognition for the optimization of reference gene selection. These methods have been compared with similar results in some reports (13,33) but not in others (15).

In this study, we also used our unpublished microarrays data to identify genes with low variation in expression levels in human adipose tissue. *FBXL10* was the gene with the highest expression stability in OM and SC human adipose tissue. This gene codes for a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes (37). In addition to its low variation, *FBXL10* has the characteristics of a housekeeping gene as it is an evolutionarily conserved and ubiquitously expressed member of the JHDM and it is essential for the maintenance of cellular function. When *FBXL10* and *IPO8* in adipose tissue were compared, both genes had a low CV, but *IPO8* exhibited a better outcome.

The choice of *IPO8* as reference gene in human OM and SC adipose samples was further supported when *18S*, *FBXL10*, and *IPO8* were used to normalize common adipocytic genes such as leptin, interleukin 6, and adiponectin. *IPO8* belongs to the importins β family, nuclear proteins involved in the nucleolar transport. Very recently it has been published that *IPO8* is required for cytoplasmic miRNA-guided gene silencing and is involved in loading Ago complexes into a variety of different mRNA targets, affecting the nuclear localization of Ago proteins (34). *IPO8* has been proposed previously as a reference gene in the human motor cortex as it showed no differences in a study with different brain regions from chronic alcoholics and control subjects (35) and lung samples (36).

Both *IPO8* and *FBXL10* performed well when OM and SC primary differentiated preadipocytes were used under different treatments which can mimic some of the changes in the humans under distinct physiological and pharmacological status. Thus, in primary cultures of human OM adipocytes the CV of *IPO8* was even better than in OM adipose tissue. Interestingly, *FBXL10* showed a slightly better CV than *IPO8* in OM differentiated preadipocytes in culture, but not in SC ones. It is noteworthy that neither *IPO8* nor *FBXL10* changed during the differentiation process reinforcing their role as control genes in these cells.

Considering that the use of reference genes for gene expression studies is an important topic, and the fact that tissue/protocols or even types of subjects can differ among laboratories, we suggest that this kind of experiments should be performed with more than one reference gene.

In conclusion, based on the evidence provided in the present study, we propose and recommend *IPO8* and *FBXL10* as appropriate reference genes, which have not been previously

ARTICLES

ADIPOCYTE BIOLOGY

identified for this purpose, in expression studies of human adipose tissue and cultured preadipocytes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (FMM2005 and 2006) to R.M.C. and M.J.O. and SAF2006-01319 from Plan Nacional (MEC) to MJO. CIBEROBN is an initiative of ISCIII (Instituto de Salud Carlos III), Spain.

DISCLOSURE

The authors declared no conflict of interest.

© 2009 The Obesity Society

REFERENCES

- Butte AJ, Dzau VJ, Glueck SB. Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues". *Physiol Genomics* 2001;7:95–96.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques* 2000;29:332–337.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169–193.
- Kouadio KE, Nishida Y, Cadrin-Girard JF, Yoshioka M, St-Amand J. Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics* 2007;8:127.
- Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res* 2002;12:292–297.
- Gabrielsson BG, Olofsson LE, Sjögren A *et al*. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obes Res* 2005;13:649–652.
- Gorzelnik K, Janke J, Engeli S, Sharma AM. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* 2001;33:625–627.
- Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rotellar F *et al*. Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 2007;39:495–500.
- Barroso I, Benito B, Gard-Jiménez C *et al*. Norepinephrine, tri-iodothyronine and insulin upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA during Brown adipocyte differentiation. *Eur J Endocrinol* 1999;141:169–179.
- Misra A, Garg A, Abate N *et al*. Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men. *Obes Res* 1997;5:93–99.
- Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y *et al*. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6676–6681.
- Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 2008;7:410–420.
- de Brouwer AP, van Bokhoven H, Kremer H. Comparison of 12 reference genes for normalization of gene expression levels in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines and fibroblasts. *Mol Diagn Ther* 2006;10:197–204.
- Szabo A, Perou CM, Karaca M *et al*. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biol* 2004;5:R59.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245–5250.
- Saviozzi S, Cordero F, Lo Iacono M *et al*. Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2006;6:200.
- Van Harmelen V, Röhrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metab Clin Exp* 2004;53:632–637.
- Samuels HH, Stanley F, Casanova J. Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. *Endocrinology* 1979;105:80–85.
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005;21:2067–2075.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM *et al*. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:R80.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F *et al*. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
- Schmittgen TD, Zakrjsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000;46:69–81.
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002;29:23–39.
- Jorgensen SM, Kleveland EJ, Grimholt U, Gjoen T. Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon. *Mar Biotechnol* 2006;8:398–408.
- Solanas M, Moral R, Escrich E. Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. *Anal Biochem* 2001;288:99–102.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM *et al*. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:856–862.
- Barbu V, Dautry F. Northern blot normalization with a 28S rRNA oligonucleotide probe. *Nucleic Acids Res* 1989;17:7115.
- Spanakis E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3809–3819.
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP. Quantification of lane-to-lane loading of poly(A) RNA using a biotinylated oligo(dT) probe and chemiluminescent detection. *BioTechniques* 1995;19:712–715.
- Gabrielsson BG, Karlsson AC, Lönn M *et al*. Molecular characterization of a local sulfonylurea system in human adipose tissue. *Mol Cell Biochem* 2004;258:65–71.
- Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Mol Cell Probes* 2000;14:127–135.
- Zhu G, Chang Y, Zuo J *et al*. Fudene, a C-terminal truncated rat homologue of mouse prominin, is blood glucose-regulated and can up-regulate the expression of GAPDH. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:951–956.
- Radonic A, Thulke S, Bae HG *et al*. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections. *Viral J* 2005;2:7.
- Weinmann L, Höck J, Ivacic T *et al*. Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell* 2009;136:496–507.
- Johansson S, Fuchs A, Okvist A *et al*. Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. *Brain Res* 2007;1132:20–28.
- Nguewa PA, Agorreta J, Blanco D *et al*. Identification of importin 8 (IPO8) as the most accurate reference gene for the clinicopathological analysis of lung specimens. *BMC Mol Biol* 2008;9:103.
- Frescas D, Guardavaccaro D, Bassermann F, Koyama-Nasu R, Pagano M. JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature* 2007;450:309–313.

Perfil de expresión en tejido adiposo OM y SC en tejido adiposo de sujetos delgados y obesos. Represión de genes involucrados en vías lipogénicas y lipolíticas.

En el presente trabajo se han desarrollado los objetivos 2 y 3 de la tesis para lo cual se analizó el perfil de expresión génica de tejido adiposo humano OM y SC de obesos mórbidos frente a pacientes delgados, resaltando las diferencias de ambos depósitos, y usando microarrays de ADN y PCR a Tiempo Real con sondas taqman como técnica de validación. Hasta el momento, no había trabajos en los que se hubiera realizado un estudio completo del perfil de expresión génica en tejido adiposo SC y OM de pacientes obesos frente a delgados, pues todos los estudios publicados eran parciales de algún modo.

El uso de microarrays representa una valiosa herramienta de comparación y búsqueda de nuevas dianas. El análisis de expresión génica en obesos, cuando se comparó con el obtenido en pacientes delgados, mostró un aumento en la expresión génica de 543 genes en tejido adiposo OM y 47 en SC, así como una bajada de la expresión en 723 genes en tejido adiposo OM y 27 genes en tejido adiposo SC (listados en anexos II).

Las alteraciones en la expresión génica no sólo se manifiestan a nivel de genes individuales, sino también de forma más amplia afectando a rutas de señalización o grupos funcionales de genes. Usando la base de datos PANTHER®, se estudiaron los procesos biológicos que estaban significativamente alterados en ambos depósitos de tejido adiposo de obesos mórbidos, atendiendo especialmente a aquellos genes relacionados con el metabolismo lipídico. Centrando la atención en este proceso, se validaron 28 genes con tarjetas microfluídicas, que incluían enzimas, proteínas de señalización y factores de transcripción involucrados principalmente en las vías lipogénicas y lipolíticas y que mostraron una expresión diferencial en los microarrays. Nuestros resultados mostraron una bajada a nivel transcripcional de los genes involucrados en ambas vías, lo que sugiere un mecanismo de defensa a la expansión y acumulación en tejido adiposo OM y SC. Nuestros datos aportan nuevos genes, no descritos previamente, que podrían estar implicados tanto en el desarrollo como en la predisposición a la obesidad, resaltando claras diferencias entre el tejido adiposo SC y el OM.

Trabajo publicado en *Obesity Surgery*. 21:633–643 (2011)

Expression Profile in Omental and Subcutaneous Adipose Tissue from Lean and Obese Subjects. Repression of Lipolytic and Lipogenic Genes

Carmen Hurtado del Pozo · Rosa María Calvo · Gregorio Vesperinas-García ·
 Javier Gómez-Ambrosi · Gema Frühbeck · Miguel Angel Rubio ·
 Maria Jesus Obregon

Published online: 5 August 2010
 © Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract The adipose tissue is a highly regulated endocrine and paracrine organ that secretes a wide variety of biologically active molecules involved in the control of energy balance and the regulation of body weight. Our work aimed to analyze the dysregulation of the adipocyte metabolism and compare the gene expression patterns between omental (OM) and subcutaneous (SC) adipose tissue from obese and lean subjects by using whole-genome DNA microarrays. OM and SC adipose tissues were obtained from 43 obese subjects undergoing bariatric surgery and from six lean individuals. Gene expression analysis was performed by whole-genome microarrays and

Taqman RT-PCR. The analysis of microarrays showed upregulation of 545 genes in OM and 47 in SC adipose tissue, whereas 723 and 27 genes were downregulated in OM and SC tissue, respectively, in obese patients. Significantly altered genes showed at least a twofold change of $p < 0.05$. Validation of the arrays with 28 genes was carried out by using low density microfluidic cards which confirmed the changes found in most genes. We focused on the altered expression of gene coding for enzymes and transcription factors involved in lipid metabolism. Interestingly, some of these genes have not been previously described in obesity. Our results show that adipose tissue from obese subjects entails defense mechanisms against an excessive expansion and fat accumulation, repressing both lipogenesis and lipolysis.

Keywords Obesity · Subcutaneous adipose tissue · Omental · Whole-genome microarrays

C. Hurtado del Pozo · R. M. Calvo (✉) · M. J. Obregon
 Instituto de Investigaciones Biomedicas Alberto Sols,
 CSIC-UAM,
 Arturo Duperier, 4,
 28029 Madrid, Spain
 e-mail: rmcervo@iib.uam.es

C. Hurtado del Pozo · R. M. Calvo · J. Gómez-Ambrosi ·
 G. Frühbeck · M. J. Obregon
 CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición
 (CIBEROBN) ISCIII,
 Madrid, Spain

G. Vesperinas-García
 Servicio de Cirugía, Hospital Universitario “La Paz”,
 Madrid, Spain

J. Gómez-Ambrosi · G. Frühbeck
 Metabolic Research laboratory, Clínica Universidad de Navarra,
 Pamplona, Spain

M. A. Rubio
 Servicio de Endocrinología y Nutrición,
 Hospital Clínico S. Carlos,
 Madrid, Spain

Introduction

Obesity is a multifactorial illness with severe associated metabolic comorbidities such as diabetes, cardiovascular damage, hyperlipemia, or cancer whose prevalence is increasing throughout the world alarmingly. Obesity is characterized by the accumulation of body fat produced by an imbalance between caloric intake and energy expenditure.

The anatomical distribution of adipose tissue plays an important role in the development of these metabolic disorders. Subcutaneous (SC) and omental (OM) fat depots are distinct and produce different metabolic effects: Omentectomy leads to a decrease of glucose and insulin levels [1], while the elimination of SC adipose tissue by

liposuction does not improve the metabolic syndrome [2]. Recently, transplantation of SC adipose tissue into the OM depot and vice versa has been performed successfully in mice [3, 4]; however, only the transplantation of SC adipose tissue into the abdominal cavity had beneficial effects, improving insulin sensitivity, glucose tolerance, and reducing body weight. Furthermore, there is an evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution, suggesting that genetically programmed developmental differences in adipocytes and their precursors in different regions of the body play an important role in obesity, body fat distribution, and potential functional differences between visceral and SC adipose tissue.

The visceral adipose tissue (OM included) is known to exhibit morphological and functional differences in comparison with SC fat, including differences of insulin action on regulation of lipolysis. The visceral adipose tissue is more abundant in men and is composed by the mesenteric fat and the epiploon or omentum. The amount of visceral fat is about 21% of the total body fat in men and only 8% in females; however, while there is a continuous increase of absolute visceral fat volume with increasing obesity in men, women do not seem to increase their visceral fat substantially until they have accumulated some 30 L of total fat volume. Above this level, the ratio of visceral to total fat storage is similar in both genders [5]. On the contrary, the SC adipose tissue is more abundant in females and is associated to an improved sensitivity to insulin and a lower risk to develop obesity-associated disorders.

So far, no whole-genome studies have been conducted to characterize possible changes in the gene expression profile comparing both OM and SC adipose tissue from obese versus lean subjects, as only partial array experiments have been conducted previously involving partial genome, a unique localization, or a unique condition (obese or lean).

In the present study, we analyzed the effect of obesity on gene expression profile of obese human SC and OM adipose tissue versus lean patients by using DNA microarrays and real-time PCR. Differences between both fat depots indicate new target genes not previously found in obesity.

Methods

Subjects

Patients were classified as obese or lean according to their body mass index (BMI), following the World Health Organization criteria, BMI ≥ 30 and < 25 kg/m², respectively. Surgeries were performed at the Hospital Universitario La Paz (Madrid), Hospital Clínico S. Carlos (Madrid), and Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona). Approval of

the protocols was obtained from the Ethical Committees of the Hospitals and our institution, in agreement with the European laws on biomedical research and with the principles of the Declaration of Helsinki.

For microarrays experiments, human adipose tissue was obtained from the OM and SC depots from 11 obese patients (seven females and four males) undergoing bariatric surgery and from six lean subjects (three males and three females) by Nissen fundoplication, after giving their informed consent. Four lean patients presented gastroesophageal reflux or hiatus hernia, but no other pathology. SC samples from two of the lean females were obtained by liposuction. For the validation experiments, further 32 obese patients (17 females and 15 males) providing 30 samples from each depot because some of them were not paired were included in the analysis maintaining the samples of the lean subjects used in the arrays. Most of the lean and obese patients were included in a previous study to address a completely different question [6].

RNA Extraction and Microarray Hybridization

RNA of each adipose sample was extracted with the RNeasy lipid tissue kit (Qiagen Madrid, Spain) following the manufacturer's protocol. Integrity and concentration of RNA were checked with the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

RNA was amplified into digoxigenin-labeled cRNA using Applied Biosystem Chemiluminiscent RT-ITV Labeling KIT (Foster City, CA, USA) for hybridization at 55°C for 16 h to "Human Genome Survey Microarray V2.0" from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), containing 60 bp oligonucleotides specific for 32,878 probes corresponding to 29,098 genes. These microarrays contain an additional 2,180 annotated genes to a total of 29,098 genes identified, based on a combination of the public and Celera Genomics databases, computational annotation, and manual curation. Ten arrays were utilized for OM adipose tissue and 14 for SC adipose tissue from men and women.

Detection at 458 nm was performed with the Chemiluminiscent Detection kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and images were collected using the 1700 Chemiluminiscent Microarray Analyzer. Chemiluminiscent signals were quantified, corrected for background and spot, and spatially normalized, according to the platform manufacturer's recommendation with the Applied Biosystems software (Foster City, CA, USA). Thus, probes having a S/N ratio below 3 and a Flag value above 5,000 in all samples were discarded. Before being compiled into an expression profile data matrix, all arrays were quantile-normalized to be comparable. This quantile normalization procedure transforms the data into log₂ scale.

Genes differentially expressed were selected by using the lineal models of the LIMMA package [7] from the

Bioconductor project (<http://www.bioconductor.org>) [8] contained in the Spotfire Integromics software. *p* values were calculated by two sample *t* test and used to calculate adjusted *p* value as false discovery rate (FDR; or expected proportion of false positives among the rejected hypotheses) using the Benjamini and Hochberg [9] procedure also included in the Bioconductor package.

The genes differentially expressed (obese versus lean) were classified by Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) which is a freely available, comprehensive online software system for relating gene sequence to specific molecular functions, biological processes, and pathways (<http://www.pantherdb.org/>)

Real-Time PCR Validation

To validate the data obtained from the arrays, we used Taqman low density arrays (LDAs) also called microfluidic cards with specific Taqman probes. Based on quantitative real-time PCR, LDAs maintain the technical sensitivity and allow to quantify simultaneously a maximal number of 384 genes per card. In our study, 18S and IPO8 served as endogenous control genes, but data were referred to IPO8 as we have recently reported IPO8 as an outstanding gene for normalization of gene expression studies in human adipose tissue in contrast to 18S [6]. For validation experiments, we included genes previously described to vary in obesity that served us as positive controls; however, most of the genes to validate the arrays were chosen on the basis of their differential expression obtained in the arrays and their relationship with processes related to obesity, but not previously described in obesity itself. Thus, genes selected by data mining were hybridized to cDNA from 32 additional obese patients and four lean subjects. The cDNA was synthesized from approximately 50 ng of each RNA sample with the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems).

PCRs were run in an ABI7900 HT Fast Real Time PCR System. Differences in gene expression were measured by the

2^{-ΔΔCt} method, which calculates the mRNA abundance in relation to a control reference gene. Statistically significant differences were determined by the Student *t* test (*p* < 0.05).

Results and Discussion

Study Population

The biochemical profile of the lean and obese patients appears in Table 1. As expected, BMI differed significantly between lean and obese subjects. Age and total cholesterol did not show statistical differences. Although significant changes were present in the plasma concentrations of basal glucose and triglycerides between lean and obese patients, they all were within the normal ranges. No differences between the two groups of obese patients (arrays and LDAs) were found.

Global View on Gene Expression Transcripts by Microarrays

The microarray data were quantified, filtered, and normalized as described in the “Methods” section. After filtering, from the original 29,098 genes, 14,564 genes (50%) in the OM depot and 19,183 genes (66%) in the SC depot were expressed with a good quality signal. From the filtered genes, 545 (3.7%) and 47 genes (0.25%) were upregulated in OM and SC tissue, respectively, and 723 (5%) and 27 (0.14%) genes were downregulated in OM and SC fat with a *p* value < 0.05. These figures represent a 43% and 64% of the overexpressed genes in the OM and SC tissues, respectively, and a 57% and 36% of the repressed genes in those tissues. A list of genes significantly altered in both depots is shown in Table 2. Only the upregulated genes with a fold change above 6 and the downregulated genes with a fold change ≤ 0.25 are shown. Many of the altered genes have not been previously described to be involved in obesity. As shown in

Table 1 Biochemical parameters of the obese and lean subjects

Parameters	Lean	Obese (arrays)	Obese (LDAs)	Range
Age (years)	41.3±6.0 (6)	39.5±3.1 (11)	41.8±2.2 (32)	
BMI (kg/m ²)	24.0±0.3 (6)	49.2±3.2* (11)	49.5±1.0* (32)	
Basal glucose (mg/dl)	91±1 (4)	108±15 (6)	114±7* (31)	60–115
Triglycerides (mg/dl)	71±12 (4)	137±36* (6)	143±25* (13)	50–175
Total cholesterol (mg/dl)	197±13 (4)	202±10 (6)	185±5 (31)	120–240

Results are means ± SEM. The numbers in brackets are the number of observations. No differences between both obese patients groups were found in any parameter

**p* < 0.05 (represent a statistical significant difference versus the lean group)

OBES SURG

Table 2 Fold changes of up- and downregulated genes obtained from microarrays from omental and subcutaneous adipose tissues from obese versus lean subjects

Gene ID	Fold change	Gene name	Gene symbol
Omental adipose tissue			
Upregulated genes			
hCG15465	14.208	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100A9
hCG38538	12.148	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	SPP1
hCG1640978	8.742	Tenomodulin	TNMD
hCG1770704	7.895	Coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A
hCG17003	7.299	Immunoglobulin J polypeptide	IGJ
hCG1811178	6.310	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	PTPRC
hCG1981379	6.199	Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	C1QA
hCG26513	6.154	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	GLIPR1
hCG1738998	6.134	Phospholipase A2, group IIA	PLA2G2A
hCG29510	6.056	Epstein-Barr virus induced gene 2	EBI2
Downregulated genes			
hCG15959	0.132	NDRG family member 4	NDRG4
hCG37534	0.141	Complement component 6	C6
hCG19652	0.188	Unassigned	Unassigned
hCG38015	0.207	Zinc finger and BTB domain containing 16	ZBTB16
hCG2023558	0.217	Unassigned	Unassigned
hCG30022	0.234	Gasdermin-like	GSDML
hCG1735841	0.235	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc	AZGP1
hCG41066	0.246	Hexokinase 2	HK2
hCG22409	0.251	WD repeat domain 24	WDR24
hCG33453	0.255	EF-hand domain family, member D1	EFHD1
Subcutaneous adipose tissue			
Upregulated genes			
hCG2007708	11.539	Unassigned	Unassigned
hCG15465	9.889	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100A9
hCG1994488	9.265	Unassigned	Unassigned
hCG1992646	8.270	Unassigned	Unassigned
hCG1820550	8.101	Unassigned	Unassigned
hCG2025429	7.936	Unassigned	Unassigned
hCG2001672	7.063	Unassigned	Unassigned
hCG1987993	6.617	Unassigned	Unassigned
hCG1981586	6.486	Unassigned	Unassigned
Downregulated genes			
hCG1770601	0.161	Unassigned	Unassigned
hCG2026755	0.175	Unassigned	Unassigned
hCG15959	0.194	NDRG family member 4	NDRG4
hCG2042959	0.203	Formin homology 2 domain containing 3	FHOD3
hCG29660	0.208	GTPase activating protein and VPS9 domains 1	GAPVD1
hCG1646516	0.234	KIAA1881	KIAA1881
hCG38015	0.239	Zinc finger and BTB domain containing 16	ZBTB16

Gene ID corresponds to Celera annotation

Table 2, calgranulin B (S100A9) was a highly induced gene in both OM and SC adipose tissues from obese patients versus leans. S100A9 is a member of the S100 family of calcium-modulated proteins that control vascular inflamma-

tion and atherothrombosis, and it has been suggested as a cardiovascular marker in type 1 diabetes [10]. S100A9 complexes with another member of the family (S100A8) and the presence of this complex, called calprotectin, has been

shown very recently to be elevated in plasma of obese patients independently of classical inflammation markers [11]. Among the downregulated genes, one of the most repressed in both OM and SC adipose depots was NDRG4 which is involved in response to stress and has been previously reported to be decreased in SC adipose tissue from obese men [12].

Although in the past 10 years numerous studies using microarrays in human adipose tissue have been published, all of them show partial results because they only used tissue from a single depot (OM or SC, but not both) [12–19], or a single group of individuals (lean or obese, but not both) [14, 18–22], or because the collection of the genes used did not include the complete genome [13–15, 20, 21, 23]. This makes the comparison of our results with already published studies difficult to interpret, and some discrepancies may be due to differences in the experimental design.

For example, our arrays differ from other reports performed in SC adipose tissue which show substantially more altered genes than those obtained in our analysis (even with less genes in the arrays). The discrepancy could be due to the use of samples of one single gender; conversely, our study included both men and women adipose tissues samples. To our knowledge, the work by Lee and coworkers [16] is the only one including both genders, but the studied population was slightly different to the general population, as Pima Indians show the highest prevalence rates of obesity and type 2 diabetes.

Biological Processes Associated with Differentially Expressed Genes

One of the aims of the studies with arrays is the interpretation of the altered genes within a biological context. By using the PANTHER® database, we studied the biological processes which are predicted to be significantly altered in both adipose depots by the changes observed in the gene expression profile between obese and lean subjects.

In both OM and SC depots, the genes included in unclassified biological processes were overrepresented among the up- and downregulated genes, exactly 18% and 36% were increased in OM and SC fat, respectively, while 26% and 20% were decreased in those adipose tissues depots (Fig. 1). Excluding this group, the induced genes in OM adipose tissue were found to be grouped mainly in processes of immunity and defense, protein metabolism, and signal transduction, while the repressed genes were associated with the two latter and also with nucleic acid metabolism (Fig. 1). In SC adipose tissue, less biological processes were represented as compared to OM tissue. Immunity and defense and signal transduction were more represented among the upregulated genes. Developmental processes, signal transduction, intracellular protein traffic, and those

related to nucleic acid metabolism were predominant among the downregulated genes (Fig. 1).

We next focused our analysis on the genes coding for proteins involved in lipid fatty acid and steroid metabolism, specifically in the lipogenesis and lipolysis pathways. In this context, the proportion of up- and downregulated genes in this pathway was 2.5% and 2.2%, respectively, in OM tissue, while in SC tissue, only repressed genes were found (6%).

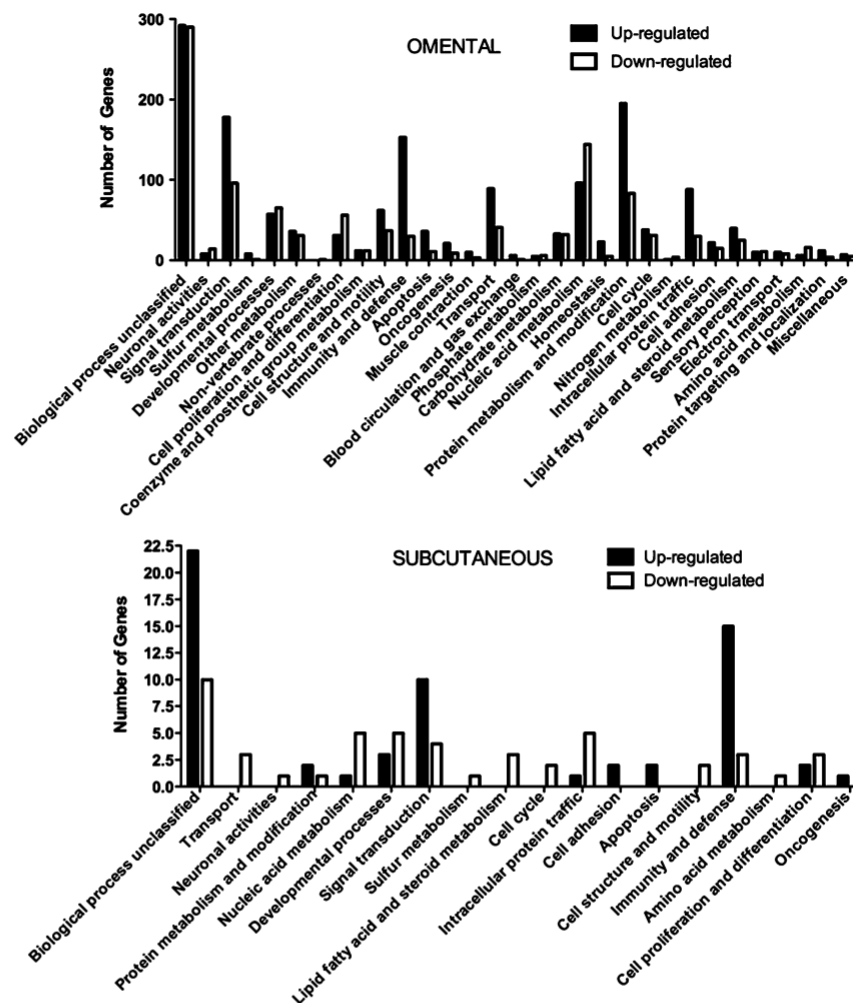
Validation of Selected Genes with Microfluidic Cards

In order to validate the microarray data, an independent technique was used with a group of genes. Twenty-eight up- and downregulated genes were further analyzed by quantitative real-time PCR in 30 additional OM and SC adipose samples from obese patients, whose adipose tissues were not included in the microarrays. Most of the chosen genes belonged to the lipid fatty acid and steroid metabolism pathway to allow us to have more confident data in this functional network of huge relevance in bioenergetics and obesity. Some of these genes are known to change in obesity and others correspond to new genes not previously reported to be altered in this pathology and whose expression changes between groups. We have validated genes involved in the molecular mechanisms that regulate the energy balance, such as transcription factors, enzymes of energy metabolism, fatty acid metabolism and cholesterol, and proteins with a role in signaling cascades. We have made two comparisons: obese versus lean patients and OM versus SC location in obese patients.

The quantitative PCR was performed by using Taqman LDAs. The LDAs included 18S and importin-8 (IPO8) as endogenous control genes, but the expression was finally referred to IPO8 as it has been shown to be the most suitable gene in OM and SC depots from obese and lean subjects, as well as in cultured differentiated preadipocytes [6]. The validation of these genes in independent adipose samples reinforces the results from the arrays. Moreover, regarding many of those genes, our data are in agreement with the expression studies recently published by other groups (see below), which validates the general performance and provides confidence in our overall data.

When analyzed by LDAs, the selected genes showed concordant results with those from the arrays, although not all the changes were always significantly different. Results appear in Table 3, which shows the differential expression in obese versus lean subjects in OM and SC adipose tissue in both LDAs and arrays and the ratio OM/SC in obese. Table 3 also shows correlation analysis of the validated genes in the OM and SC depots with the biochemical parameters (BMI, glucose, cholesterol, and triglycerides) of the subjects included in the LDA study.

Fig. 1 Biological processes altered in omental (*upper panel*) and subcutaneous (*lower panel*) adipose tissues from obese versus lean subjects, as predicted by the PANTHER database



The most striking result in this expression analysis is the repression of lipid metabolism in general, suggesting a defensive mechanism against an excess of fatty acids. As shown in Table 3, OM adipose tissue is more affected than SC tissue in obesity, confirming the results from the arrays and suggesting the relationship between visceral obesity and other pathologies such as insulin resistance, hyperlipemias, and cardiovascular disease. In addition, most of the significant correlations were found in genes from this depot with the plasmatic triglycerides levels.

Two essential and antagonic pathways, lipolysis and lipogenesis, play a crucial role in energy balance. Alterations in these pathways are associated with obesity [24]. Both are repressed in our study in a significant manner in OM and SC adipose tissue, though repression is higher in the OM depot as determined from our results with the arrays confirmed by

microfluidic cards. The more likely cause is the higher sensitivity of OM tissue to catecholamines stimulated lipolysis, whereas the SC tissue is more sensitive to the antilipolytic effect of insulin [24].

The fatty acid synthase (FASN) and acetyl-CoA-carboxylase 2 (ACACB) are essential for lipogenesis. These enzymes play an important role in the development of obesity and regulation of body weight [25]. Their repression blocks the synthesis of triglycerides, which suggests it can be a defensive mechanism against an excess of fatty acids. The repression of FASN decreases the body weight in rodents, increases the β -oxidation of fatty acids, and decreases the appetite suggesting a role as a regulator of energy homeostasis [25–27]. Our array data show a decrease in FASN in both OM and SC adipose tissues, in agreement with previous studies [14, 28]. ACACB was

Table 3 List of altered genes from the microarrays validated using quantitative Taqman RT-PCR

Symbol	Name	Fold change OB/LN		Fold change OB/LN		Ratio OM/SC	
		OM		SC		Obese	
		RT-qPCR	Microarrays	RT-qPCR	Microarrays	RT-qPCR	Microarrays
AZGP1	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc	0.382* b	0.23*	0.255* b	0.45*	1.935*	
FASN	Fatty acid synthase	0.387* a,c		0.939	0.56*	0.796	
ACACB	Acetyl-coenzyme A carboxylase beta	0.405*	0.35	0.394* b ₁ (-d)	0.47	0.675*	
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	0.406* c	0.45	0.532*	0.45	0.549*	
MLXIP1	MLX interacting protein-like	0.424* c	0.30*	0.564*	0.55	0.255*	
CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	0.497* b	0.31*	0.380* b	0.37	0.992	
NCOA6	Nuclear receptor coactivator 6	0.505* (-c)	0.62*	0.603	0.75	0.762*	
ADCY3	Adenylate cyclase 3	0.506* c	0.57*	0.575* b	0.74	0.752*	
PIAS3	Protein inhibitor of activated STAT, 3	0.551* c	0.54*	0.649	0.78	0.460*	
ZBTB16	Zinc finger and BTB domain containing 16	0.552	0.21*	0.447* b ₁ (-d)	0.24*	0.766	
ADCY2	Adenylate cyclase 2	0.574* (-d)	0.47*	0.629	0.77	1.03	
GYSI	Glycogen synthase 1 (muscle)	0.574 c	0.50*	0.780*	0.75	0.550*	
ADCY1	Adenylate cyclase 1	0.581* b	0.54*	0.668	0.81	1.637*	
PYGM	Phosphorylase glycogen; muscle	0.591* c	0.47*	0.599	0.5	1.338*	
ACOX2	Acyl-coenzyme A oxidase 2, chain	0.604* c	0.57*	0.600* b ₁ (-d)	0.61	0.750*	
ECHDC2	Enoyl coenzyme A	0.609* c	0.33*	0.542* b	0.524	0.296*	
ADCY4	Adenylate cyclase 4	0.611* c	0.41*	1.08	0.93	0.491*	
FOXO1A	Forkhead box O1	0.612*	0.41*	0.612* b ₁ (-d)	0.55	0.750*	
HOXA7	Homeobox A7	0.640* c	0.62*	0.955	0.74	0.535*	
ADCY6	Adenylate cyclase 6	0.706 c	0.47*	0.731	0.67	0.580*	
ADCY5	Adenylate cyclase 5	0.936	0.32	0.8	0.39*	0.368*	
LEPROTL1	Leptin receptor	1.539*	1.71*	1.245		0.852*	
SC4MOL	Sterol-C4-methyl oxidase-like	1.896*	1.75*	2.910* (-b)	1.44	0.685*	
ALOX5AP	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	2.350* (-b)	3.35*	1.095	2.02	1.388*	
NPY5R	Neuropeptide Y receptor Y5	2.970*	1.85	2.081*		1.799*	
NPY1R	Neuropeptide Y receptor Y1	3.420*	3.48	1.724	1.07	1.565*	
LEP	Leptin	5.426*	3.86*	1.185	1.24	0.493*	
TNMD	Tenomodulin	9.917* (-c)	8.74*	2.321*	2.64	1.192	

The fold changes in the OM and SC adipose depot from OB versus LN subjects, from RT-PCR and microarrays are shown, as well as the ratio between both depots from obese individuals. Letters a, b, c, or d represent a statistically significant correlation between the corresponding gene mRNA levels by LDA and plasma glucose levels, BMI values, plasma triglycerides levels, or plasma cholesterol levels, respectively. Most correlations were positive; negative correlations are shown with a (-) symbol. All correlations were statistically significant ($p < 0.05$)

SC subcutaneous, OM omental, OB obese, LN lean

* $p < 0.05$ (represents a statistical significant difference)

decreased in our study in the obese group. This is in contrast with the knockout mice that showed a lean phenotype [29], but in agreement with a study with obese Zucker rats and their lean counterparts, which in addition showed major species differences in adipose SC and visceral depots in humans and rats [30]. Two transcription factors, sterol regulatory element binding transcription factor-1 (SREBF1) and MLX interacting protein-like (MLXIPL), which regulate the transcription of genes involved in the lipogenic pathway [31], are repressed in OM and SC adipose tissue. In addition, MLXIPL induces the glycolytic pathway, in response to insulin and glucose, and reduces it in the presence of polyunsaturated fatty acids [32]. Though SREBF1 has been associated to obesity in humans [33], to our knowledge, it is the first time that MLXIPL is described as a downregulated gene in human adipose tissue obtained from obese patients. The decrease in lipogenic genes, more acute in the OM depot, could also be associated to an inflammation enhancement. As already seen in Fig. 1, genes involved in immunity and defense processes were highly represented, mostly those which showed upregulation. This is in agreement with Poulain-Godefroy and coworkers who found an association between an increased inflammation and a decrease of lipogenic markers in omental fat women [34].

Regarding the lipolysis, it would be expected to be increased in response to a fat excess, but not all the enzymes participating in this pathway are induced. Thus, enzymes as acyl-coenzyme A oxidase 2 (ACOX2) that initiates the β -oxidation are repressed in the OM depot as a likely effect against an induction of other enzymes in the ulterior phase of dehydrogenation of fatty acids. Mitchell et al. found a linkage of serum insulin to chromosome 3p in the region that contains the ACOX2 gene [35]. Recently, it has been reported that cell death-inducing DFFA-like effector A (CIDEA) is involved in the regulation of lipid storage in human adipocytes [36], regulating lipolysis. When CIDEA is overexpressed, lipogenesis increases and lipolysis decreases. CIDEA is repressed in our study in both OM and SC depot from obese people, but more in SC tissue, where repression of lipogenesis is not as pronounced as in OM depot. Dahlman et al [14] found an upregulation of CIDEA in the SC fat of obese women submitted to energy-restricted diets.

Among the genes involved in lipolysis, adenylyl cyclases (ADCY) are clearly repressed, mostly in OM tissue. It is important to note that four out of the six ADCYs downregulated in the arrays were confirmed by the LDA validation. Thus, ADCY1, ADCY2, ADCY3, and ADCY4 were decreased in the OM tissue of obese patients, among all the ADCYs, and ADCY3 was also repressed in the SC depot. The ADCY catalyzes the conversion of ATP into cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP), which

regulates several physiological functions in mammals including lipolysis. cAMP is generated by two families of enzymes from the ADCY superfamily: One comprises of transmembrane ADCY encoded by nine distinct genes (ADCY1 to ADCY9) with key roles in cellular responses. Until now, the isoforms of the human fat were unclear; however, rat preadipocytes and adipocytes from epididymal white fat also express types 2, 4, 5, and 6 ADCY isoforms [37]. Recently, it has been shown that a polymorphism in the ADCY3 gene is associated with obesity in a population of Swedish men [38]. Moreover, adult type 3 ADCY-deficient mice are obese [39]. Surprisingly, no previous reported microarray studies found alterations of the expression of these proteins.

This ADCY repression could be due to the sympathetic tone that is known to influence weight gain. Adenosine is considered a regulatory metabolite and signals via binding to the four adenosine receptors (AR) classified by their ability to inhibit or stimulate ADCY. The most prominent target of the A1AR is ADCY, and because it couples to Gi proteins, its agonistic binding leads to inhibition of the ADCY enzymes. In this way, agonists of A1AR inhibit ADCY in BAT [40]. A1AR are predominant in white fat and measurement of ADCY activity and regulation in isolated adipocytes and isolated plasma membranes suggest that A1AR is unusually and tonically active in obese rats, lowering ADCY levels, through the Gi proteins, and thereby lowering cAMP levels in these tissues and inhibiting lipolysis [41].

Although A1AR was filtered in our arrays and we cannot be certain that a high A1AR expression occurs in human obesity, our results show arguments in favor of an abnormally active inhibitory branch of the ADCY system that could influence and decrease the lipolytic pathway in these subjects confirming the low lipolysis observed in obese patients in vivo [42, 43].

Another antilipolytic regulator is NPY. Its receptors NPY1R and NPY5R are involved in the regulation of body weight and are overexpressed in OM adipose tissue, in agreement with previous results [13]. In our study, NPY5R was also altered in SC adipose tissue.

In this balance between synthesis and degradation of triglycerides, another anabolic pathway is affected in our results: gluconeogenesis. The study of this pathway has been focused in liver or muscle in obese individuals but not in adipose tissue. The synthesis of glycogen is the result of glycogen synthase 1 (GYS1) and glycogen phosphorylase (PYGM) activity [44]. Both enzymes are repressed in OM and SC adipose tissue of obese patients and also forkhead box O1 (FOXO1A), the transcription factor that activates the process of gluconeogenesis [45]. The repression of the synthesis of glycogen is due to the insulin resistance state that is characterized by a decrease in insulin action,

implying an alteration in the actions of the hormone on carbohydrates, lipids, and protein metabolism.

Another signaling pathway in obesity is the one related to leptin because obesity is characterized by high leptin levels and leptin resistance. Leptin signaling is mediated by its receptors and the JAK/STAT pathway, and the resistance decreases the activation of this pathway [46]. STAT3 is regulated by PIAS3 [47] whose expression is depressed in our study. Though we have not found previous results regarding PIAS3 in human adipose tissue, Deng et al. [48] showed an increased expression in *ob/ob* mice which is in contrast with our results; however, *ob/ob* mice are leptin deficient and are not comparable to human obesity in which leptin is high. In fact, these authors suggest that PIAS3 increase could be a consequence of the absence of leptin because high fat diet-induced obese rats had unchanged PIAS3 mRNA levels [49].

Another gene involved in the neovascularization is tenomodulin (TNMD). This protein expression correlates with leptin levels and is associated with insulin resistance [50]. Though TNMD has a general role against angiogenesis, its specific function in adipose tissue is not known. In our study, TNMD is induced in both depots from obese individuals in agreement with very recently published results [51].

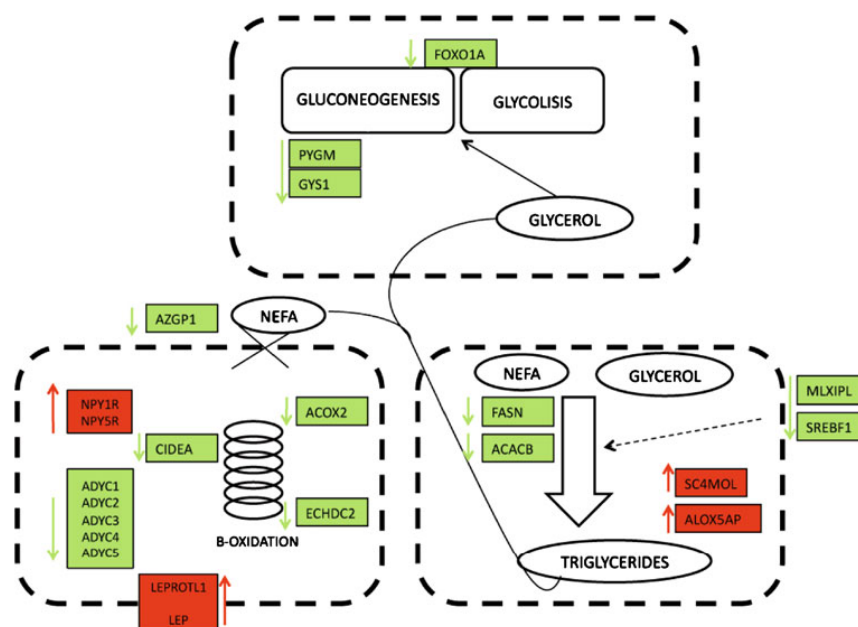
Our study, in addition, has allowed to find a variety of transcription factors that might have a role in the development of obesity. Of those, we have validated a few like *Hoxa7*, a gene involved in development that has been related to obesity development and fat distribution [52]; *Foxo1* (already

mentioned above) because it promotes the transcription of genes that increase glucose production together with *PGC1 α* [53]; *NCOA6*, is a key coactivator of multiple nuclear receptors and transcription factors that include the adipogenic *PPARG* and *CEBPA* [54]; and *ZBTB16*, members of the Krüppel-like factor family, with a repressor function. Among the genes of this family, *klf2* has been described as a negative regulator of the adipocyte differentiation [55]. *ZBTB16* could be a candidate involved in metabolic syndrome as it is found in a genomic region that has been associated with higher body weight, higher lipid profile, and insulin resistance in rats [56]. Figure 2 shows a scheme of some of the altered genes in these pathways.

One limitation of our study is the use of whole adipose tissue which includes other cell types different to adipocytes such as the stromal vascular fraction. At this respect, an increased inflammatory response and macrophage infiltration of the adipose tissue have been shown in severely obese patients [57].

The use of microarrays for the study of obesity represents a powerful tool to determine differences in the expression profile of obese patients. These differences reveal potential pathways involved in the origin and development of this pathology that might be used to develop new therapeutic strategies. This genome-wide study reveals that obese subjects entail defense mechanisms against an excessive expansion and fat accumulation, as they present decreased lipolysis and lipogenesis in both fat depots. Our study also reveals a large number of genes not

Fig. 2 Scheme showing most of the up- and downregulated genes validated with RT-PCR Taqman probes from the array study in omental and subcutaneous adipose tissue from obese patients



previously classified in functional processes due to the lack of knowledge about the function of many genes and the pathway involved. Fortunately, the functional databases are being regularly updated and the interpretation of our data can be continuously re-evaluated.

Acknowledgments This work was supported by grants from Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (FMM2005 and 2006) to RMC and MJO and SAF2001-2243 and SAF2006-01319 from Plan Nacional (MEC) to MJO. CIBEROBN is an initiative of Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain. We thank the Genomic Unit from CNIC (Madrid) for the microarray processing and Integromics (Granada, Spain) for their help processing and statistics of the microarray data. We thank Ricardo Escalante for critical reading of the manuscript.

Conflict of interest disclosure The authors have no conflicts of interest.

References

- Thorne A, Lonnqvist F, Aelman J, et al. A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26:193–9.
- Klein S, Fontana L, Young VL, et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2004;350:2549–57.
- Hocking SL, Chisholm DJ, James DE. Studies of regional adipose transplantation reveal a unique and beneficial interaction between subcutaneous adipose tissue and the intra-abdominal compartment. *Diabetologia*. 2008;51:900–2.
- Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, et al. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab*. 2008;7:410–20.
- Kvist H, Chowdhury B, Grangard U, et al. Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: predictive equations. *Am J Clin Nutr*. 1988;48:1351–61.
- Hurtado del Pozo C, Calvo RM, Vesperinas-Garcia G, et al. IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:897–903.
- Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article3.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5:R80.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;57:289–300.
- Johansson F, Kramer F, Barnhart S, et al. Type 1 diabetes promotes disruption of advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:2082–7.
- Mortensen OH, Nielsen AR, Erikstrup C, et al. Calprotectin—a novel marker of obesity. *PLoS ONE*. 2009;4:e7419.
- Shea J, French CR, Bishop J, et al. Changes in the transcriptome of abdominal subcutaneous adipose tissue in response to short-term overfeeding in lean and obese men. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:407–15.
- Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Diez-Caballero A, et al. Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *FASEB J*. 2004;18:215–7.
- Dahlman I, Linder K, Arvidsson Nordstrom E, et al. Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:1275–85.
- Maury E, Ehala-Aleksejev K, Guiot Y, et al. Adipokines over-secreted by omental adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E656–65.
- Lee YH, Nair S, Rousseau E, et al. Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia*. 2005;48:1776–83.
- Meugnier E, Faraj M, Rome S, et al. Acute hyperglycemia induces a global downregulation of gene expression in adipose tissue and skeletal muscle of healthy subjects. *Diabetes*. 2007;56:992–9.
- Wang S, Sparks LM, Xie H, et al. Subtyping obesity with microarrays: implications for the diagnosis and treatment of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33:481–9.
- Capel F, Viguerie N, Vega N, et al. Contribution of energy restriction and macronutrient composition to changes in adipose tissue gene expression during dietary weight-loss programs in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4315–22.
- Gabrielsson BG, Johansson JM, Lonn M, et al. High expression of complement components in omental adipose tissue in obese men. *Obes Res*. 2003;11:699–708.
- Gabrielsson BG, Johansson JM, Jennische E, et al. Depot-specific expression of fibroblast growth factors in human adipose tissue. *Obes Res*. 2002;10:608–16.
- Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, et al. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res*. 2004;12:1217–22.
- Gabrielsson BL, Carlsson B, Carlsson LM. Partial genome scale analysis of gene expression in human adipose tissue using DNA array. *Obes Res*. 2000;8:374–84.
- Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med*. 1995;27:435–8.
- Mobbs CV, Makimura H. Block the FAS, lose the fat. *Nat Med*. 2002;8:335–6.
- Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, et al. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:1921–5.
- Lofus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*. 2000;288:2379–81.
- Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:13–20.
- Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, et al. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:16480–5.
- Kreuz S, Schoelch C, Thomas L, et al. Acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 show distinct expression patterns in rats and humans and alterations in obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25:577–86.
- Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol*. 2002;63:2075–80.
- Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest*. 2005;115:2843–54.
- Oberkofler H, Fukushima N, Esterbauer H, et al. Sterol regulatory element binding proteins: relationship of adipose tissue gene expression with obesity in humans. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1575:75–81.

34. Poulain-Godefroy O, Lecoœur C, Pattou F, et al. Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1–7.
35. Mitchell BD, Cole SA, Hsueh WC, et al. Linkage of serum insulin concentrations to chromosome 3p in Mexican Americans. *Diabetes*. 2000;49:513–6.
36. Misra A, Garg A, Abate N, et al. Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men. *Obes Res*. 1997;5:93–9.
37. Serazin-Leroy V, Morot M, de Mazancourt P, et al. Differences in type II, IV, V and VI adenylyl cyclase isoform expression between rat preadipocytes and adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1550:37–51.
38. Nordman S, Abulaïti A, Hilding A, et al. Genetic variation of the adenylyl cyclase 3 (AC3) locus and its influence on type 2 diabetes and obesity susceptibility in Swedish men. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:407–12.
39. Wang Z, Li V, Chan GC, et al. Adult type 3 adenylyl cyclase-deficient mice are obese. *PLoS ONE*. 2009;4:e6979.
40. Schimmel RJ, McCarthy L, Dzierzanowski D. Effects of pertussis toxin treatment on metabolism in hamster brown adipocytes. *Am J Physiol*. 1985;249:C456–63.
41. Dhalla AK, Chisholm JW, Reaven GM, et al. A1 adenosine receptor: role in diabetes and obesity. *Handb Exp Pharmacol* 2009;271–95.
42. Lillioja S, Foley J, Bogardus C, et al. Free fatty acid metabolism and obesity in man: in vivo in vitro comparisons. *Metabolism*. 1986;35:505–14.
43. Connacher AA, Bennet WM, Jung RT, et al. Effect of adrenaline infusion on fatty acid and glucose turnover in lean and obese human subjects in the post-absorptive and fed states. *Clin Sci (Lond)*. 1991;81:635–44.
44. Taylor AJ, Ye JM, Schmitz-Peiffer C. Inhibition of glycogen synthesis by increased lipid availability is associated with subcellular redistribution of glycogen synthase. *J Endocrinol*. 2006;188:11–23.
45. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*. 2003;423:550–5.
46. Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, et al. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell*. 2002;2:497–503.
47. Chung CD, Liao J, Liu B, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*. 1997;278:1803–5.
48. Deng J, Hua K, Caveney EJ, et al. Protein inhibitor of activated STAT3 inhibits adipogenic gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339:923–31.
49. Peiser C, McGregor GP, Lang RE. Leptin receptor expression and suppressor of cytokine signaling transcript levels in high-fat-fed rats. *Life Sci*. 2000;67:2971–81.
50. Tolppanen AM, Pulkkinen L, Kolehmainen M, et al. Tenomodulin is associated with obesity and diabetes risk: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:1082–8.
51. Saiki A, Olsson M, Jernas M, et al. Tenomodulin is highly expressed in adipose tissue, increased in obesity, and down-regulated during diet-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:3987–94.
52. Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:6676–81.
53. Puigserver P, Rodgers JT, Foxa2, a novel transcriptional regulator of insulin sensitivity. *Nat Med*. 2006;12:38–9.
54. Lee J, Saha PK, Yang QH, et al. Targeted inactivation of MLL3 histone H3-Lys-4 methyltransferase activity in the mouse reveals vital roles for MLL3 in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:19229–34.
55. Hackl H, Burkard TR, Sturm A, et al. Molecular processes during fat cell development revealed by gene expression profiling and functional annotation. *Genome Biol*. 2005;6:R108.
56. Seda O, Liska F, Sedova L, et al. A 14-gene region of rat chromosome 8 in SHR-derived polydactylous congenic substrain affects muscle-specific insulin resistance, dyslipidaemia and visceral adiposity. *Folia Biol (Praha)*. 2005;51:53–61.
57. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796–808.

Estudio de la expresión en obesidad del factor de transcripción ChREBP en hígado, tejido adiposo y preadipocitos humanos diferenciados.

El cuarto objetivo de esta tesis se centró en el estudio del factor de transcripción ChREBP en tejido adiposo e hígado de pacientes obesos mórbidos y en preadipocitos humanos diferenciados *in vitro*. Tras observar en el estudio de microarrays de ADN que las vías lipogénica y lipolítica estaban reprimidas en condiciones de obesidad mórbida, quisimos estudiar uno de los factores que regulan los niveles de transcripción de las enzimas lipogénicas.

El mecanismo por el cual ChREBP actúa, ha sido ampliamente estudiado en distintos modelos experimentales, sin embargo los niveles de expresión de este factor de transcripción no se conocen en profundidad en todos los tejidos. Son varios los estudios que muestran un aumento del ARNm cuando se expone a altas concentraciones de glucosa, en células beta, hepatocitos y preadipocitos murinos 3T3-L1 (Dentin et al., 2004; He et al., 2004; Li et al., 2003; Wang and Wollheim, 2002). Sin embargo hasta la fecha no había ningún estudio realizado en preadipocitos humanos. Además, la mayoría de los estudios se habían realizado en modelos animales y se habían centrado en el papel de ChREBP en hígado, ya que la capacidad lipogénica de este tejido es mayor que la del tejido adiposo. Pero no hay que olvidar que el tejido adiposo es uno de los órganos más importantes en el metabolismo lipídico y de la glucosa, lo que nos hacía pensar que ChREBP pudiera desempeñar un papel funcional importante en este tejido.

El factor de transcripción ChREBP mostró una expresión opuesta en hígado y tejido adiposo. Al igual que otras enzimas como FASN involucrada en la lipogénesis, observamos un aumento de los niveles de ARNm en hígado y una disminución en tejido adiposo de obesos mórbidos. En cuanto a la expresión de ChREBP en los preadipocitos, tanto a nivel de mRNA como de proteína, ChREBP aumentó notablemente a lo largo de la diferenciación al igual que otros marcadores típicos de los adipocitos, lo que sugiere que pueda desempeñar un papel importante en la regulación de los mismos.

Manuscrito enviado a *International Journal of Obesity*

ChREBP expression in liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity.

Carmen Hurtado del Pozo, BSc¹, Gregorio Vesperinas-García, MD², Miguel-Ángel Rubio, MD³, Ramón Corripio-Sánchez, MD², Antonio J. Torres-García, MD⁴, Maria-Jesus Obregon, PhD^{1*}, Rosa María Calvo, PhD^{1*&}

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM. Madrid. Spain. ² Servicio de Cirugía, Hospital Universitario “La Paz”, Madrid, Spain. ³ Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Clínico S. Carlos, Madrid, Spain. ⁴ Servicio de Cirugía, Hospital Clínico S. Carlos, Madrid, Spain. * Same contribution.

ABSTRACT

Objective: ChREBP is an essential transcription factor for lipogenesis. Its physiological role in adipose tissue has been little studied and control of its expression remains unknown in human adipocytes. We have studied ChREBP mRNA and protein expression levels in the liver and the omental (OM) and subcutaneous (SC) adipose tissues in obese and lean subjects, as well as in human differentiated preadipocytes.

Subjects and methods: 43 patients were classified as lean or obese according to body mass index. Liver and OM and SC adipose tissues biopsies were obtained. Human preadipocytes were isolated from the adipose tissues from obese patients and differentiated under adipogenic conditions. Reverse-transcription polymerase chain reaction and Western blot analyses were performed to quantify the ChREBP expression levels.

Results: We found opposite *ChREBP* regulation in the liver and adipose samples. ChREBP increased in the liver from obese compared to lean subjects, whereas the expression decreased in both adipose tissues. The mRNAs of other adipogenic markers were checked in these tissues. The pattern of *FASN* was similar to the one for *ChREBP*, *AP2* was only decreased in OM adipose tissue of obese patients and *ATGL*, a main lipase involved in lipolysis, did not change between groups. The levels of ChREBP mRNA and protein showed dramatic increases during the differentiation of both human OM and SC preadipocytes.

Conclusion: ChREBP expression has an opposite regulation in the liver and adipose tissue from obese subjects which is compatible with the increased hepatic lipogenesis and decreased adipocytic lipogenesis found in these patients. ChREBP could be an important transcription factor involved in adipogenesis, as its mRNA and protein levels showed dramatic increases in differentiated preadipocytes.

Keywords: ChREBP, opposite regulation, human liver, subcutaneous adipose tissue, omental, preadipocytes

&Corresponding author: Rosa María Calvo, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM. Arturo Duperier, 4. 28029 Madrid. Spain
e-mail: rmcavlo@iib.uam.es

Manuscrito enviado al International Journal of Obesity

INTRODUCTION

Dysregulation of the synthesis of fatty acids (lipogenesis) contributes to metabolic disease such as obesity, hepatic steatosis, diabetes and cardiovascular diseases (1). Liver and adipose tissue are the main organs where lipogenesis takes place, being glucose the primary source of carbons for fat biosynthesis. Triglycerides (TG) are synthesized from fatty acids and glycerol; in the liver, TG can be packaged into VLDL and secreted into the circulation, stored as lipid

droplets or they can enter the beta-oxidation pathway. In the adipose tissue, TG are mainly stored, thus being a major source of energy. In both tissues lipogenesis is controlled by hormonal and nutritional signals (insulin and glucose). Insulin secreted in response to elevated blood glucose levels, is well known to increase transcription of lipogenic genes mediated by SREBP-1 in liver (2). However, the mechanism that activates the glucose signaling pathway by an excess of carbohydrates was not well known until the discovery of the transcription factor Carbohydrate Response element-binding protein (ChREBP). ChREBP activation by glucose induces the gene expression of most enzymes involved in lipogenesis (3) and the liver pyruvate kinase, an essential regulator of glycolysis, as well. Other target genes of ChREBP are involved in the NADPH supply system and gluconeogenesis (4).

Despite the extensive knowledge gained in recent years regarding the role of ChREBP in the liver, its physiological role in adipose tissue has been barely studied and control of its expression remains unknown in adipocytes. Moreover, most of the questions regarding ChREBP regulation have been always addressed in rodent models but not in human samples. To our knowledge, this is the first study involving human tissues, not only liver but two locations of adipose tissue as well, and we have found that, in adipocytes, unlike in hepatocytes, though the regulation of ChREBP expression is the expected one in differentiated preadipocytes, there is a dysregulation in the adipose tissue of obese patients characterized by a decrease in *ChREBP* followed by a concomitant decrease in *FASN*, which is in contrast with the increase observed in the liver from obese patients.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects, tissue samples and cell cultures.

Patients were classified as obese or lean according to their body mass index (BMI), following the World Health Organization criteria, BMI ≥ 30 and < 25 kg/m², respectively. Surgeries were performed at the Hospital Universitario La Paz (Madrid) and the Hospital Clínico Universitario S. Carlos (Madrid).

Informed written consent was obtained from all the patients.

The protocols were approved by the Ethical Committees of all the institutions involved following the principles of the Declaration of Helsinki.

For expression analysis experiments in whole tissues, human adipose tissue from two locations, omental (OM) and subcutaneous (SC), were obtained from 24 obese patients undergoing bariatric surgery and from 11 lean patients who presented hiatus hernia, gastroesophageal reflux or esophageal achalasia. In addition, human liver was obtained from 9 out of the above obese patients and from 4 lean patients with esophageal achalasia.

For expression experiments conducted in primary cultures of OM and SC preadipocytes, human adipose tissue from both regions was obtained from 8 additional obese patients, under the above ethical considerations. Preadipocytes were isolated and differentiated under defined adipogenic conditions as previously shown (5). Differentiated preadipocytes were harvested at 0, 3, 6 and 12 days. (mRNA, n=3 from each depot).

To investigate the influence of insulin on *ChREBP* mRNA expression, after a 10 day differentiation period, cells were treated for 48 additional hours with 10% depleted newborn calf serum, and treated or not with 100 mM insulin during the last 24 h. Cells were harvested at day 12. Depleted serum was obtained as previously described (6) and showed undetectable levels of insulin when measured by RIA.

RNA extraction and quantitative Taqman RT-PCR

RNA of tissue samples and differentiated preadipocytes was extracted with the RNeasy lipid tissue kit (Quiagen, Madrid, Spain) following the manufacturer's protocol. Integrity and concentration of RNA were checked with the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). cDNA from 1 μ g of each RNA sample was synthesized using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) according to the kit instructions. The expression levels of *ChREBP*, *FASN*, *ATGL*, *ADCY3*, *AP2* and *PPARG* mRNAs

were analyzed by Taqman RT-PCR using predesigned Taqman Assays on demand probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Data were referred to *IPO8* as endogenous control gene, as we have recently reported *IPO8* as an outstanding gene for normalization of gene expression studies in human adipose tissue and differentiated preadipocytes in primary cultures (7). Liver samples were also referred to *IPO8*, after checking in some experiments that the results obtained with *IPO8* remained constant as compared to other endogenous controls such as 18S and cyclophilin (*PPIA*) (not shown).

Western-blot

Total protein extracts were obtained from tissues and cells using standard protocols. Seventy-five μ g of each sample were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (PROTRAN, Whatman Inc, Florham Park, NJ) in a buffer containing 25mM Tris, 200 mM glycine and 20% methanol. After blocking the membrane with 5% low-fat dried milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20, the levels of ChREBP protein were detected using a 1:500 dilution of the specific antibody (sc-21189, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by a 1:7500 dilution of IRDye 800CW donkey anti-goat IgG (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Beta-actin antibody (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used as a loading control followed by incubation with IRDye 800 anti-mouse IgG (LI-COR, Lincoln, NE). All immunoreactive fluorescent bands were visualized on the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

and quantified by ImageJ 1.410 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

Statistical analysis

Results of mRNA expression among groups are shown as fold-changes which were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Other data are means \pm SEM. Statistically significant differences between two groups were determined by the Student t-test ($P < 0.05$). Correlation analysis was determined by Pearson's correlation coefficient test (r).

RESULTS

Biochemical profile of the patients.

The biochemical parameters of the different patients included in this study appear in Table 1. No significant differences were observed in the age of the patients among groups. As expected, BMIs from the obese groups were higher than those from their respective leans. No changes were observed in basal glucose, triglycerides or total cholesterol in plasma, between lean and obese patients used for the study of the liver. Regarding the lean and obese subjects used for the adipose tissue samples, although glycemia and triglyceridemia were significantly increased ($P < 0.05$) in the obese groups compared to the lean patients, the variables were within normal ranges.

Liver biopsias from all the obese subjects showed mild to moderated fat infiltration. Although fat infiltration was not studied in the hepatic samples from the lean patients, we compared ALT levels in both lean and obese groups being 27.8 ± 1.9 and 44.3 ± 7.6 , respectively ($p < 0.05$).

Table 1. Biochemical parameters of the obese and lean subjects included in the study.

	LEAN LIVER	OBESE LIVER	LEAN ADIPOSE	OBESE ADIPOSE	OBESE CULTURES	Range
Sex (M/F)	2/2	1/8	4/7	5/19	3/5	
Age (years)	44.2 \pm 6.4	42.9 \pm 3.3	47.6 \pm 3.6	44.0 \pm 2.3	41.1 \pm 5.5	
BMI (kg/m ²)	23.6 \pm 0.8	47.8 \pm 2.2 ^a	23.0 \pm 0.5	49.8 \pm 1.5 ^b	47.9 \pm 2.1 ^b	
Glucose (mg/dl)	89.5 \pm 5.4	106.1 \pm 12.8	86.3 \pm 2.6	99.8 \pm 5.9 ^b	115.6 \pm 8.0 ^b	60-115
Cholesterol (mg/dl)	186.3 \pm 10.5	172.9 \pm 12.5	193.8 \pm 6.6	186 \pm .28.9	195.6 \pm 12.0	120-240
Triglycerides (mg/dl)	69.3 \pm 7.1	81.9 \pm 4.8	65.9 \pm 5.6	99.3 \pm 9.9 ^b	152.4 \pm 17.0 ^b	50-175

Results are means \pm SEM. ^a and ^b represent a statistical significant difference ($p < 0.05$) versus the respective lean group, comparing livers (^a) and adipose tissues (^b), respectively.

ChREBP expression in liver and in omental and subcutaneous adipose tissues from lean and obese subjects.

The *ChREBP* mRNA expression was studied in the liver and the OM and SC adipose tissues from lean and obese individuals. As shown in Figure 1A, opposite regulation was found in the liver and adipose samples: the expression in the liver from obese patients doubled that one from the leans, whereas in both adipose tissues, the expression was decreased significantly by 50% or more (in OM). In order to compare the expression among tissues from lean individuals, *ChREBP* mRNA was referred to the liver which showed the higher levels. The expression of the transcript in the SC adipose tissue from lean individuals decreased about 15% from that of the liver, whereas the one from the OM depot was even lower as this depot presented levels of *ChREBP* mRNA which were two thirds of the hepatic levels, although changes were not significant (Figure 1B).

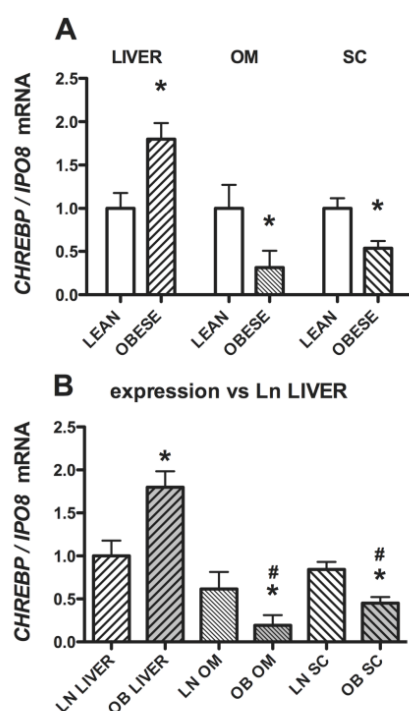


Figure 1. ChREBP mRNA in liver, omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. A) Each tissue is compared to its respective lean group. B) Groups are expressed vs lean liver. * $p < 0.05$ vs lean subjects, # $p < 0.05$ vs liver

To investigate the protein levels, tissue extracts were obtained and western-blot performed. Figure 2A shows a representative western-blot with liver samples from obese and lean subjects, and a positive control from human HepG2 cells. As shown, the levels of ChREBP protein were higher and clearly detected in the livers from obese individuals as compared to those from the lean, which could be hardly detected. When the levels were quantified and normalized to the beta-actin levels, ChREBP protein in the obese group increased about 3 times over the levels in the lean group (Figure 2B). Though we tried doing western-blot with adipose tissue samples from both depots, no signal was detected even when increasing total amounts of protein up to 150 μ g, suggesting that ChREBP protein levels are present in similar amounts to those of the mRNA, being the liver, the tissue with higher levels of both mRNA and protein. This result was further confirmed by correlation analysis with the hepatic samples: Relative *ChREBP* mRNA expression significantly correlated with ChREBP protein levels ($r = 0.846$, $p = 0.0082$) (Figure 2C).

We then performed correlation analysis of the *ChREBP* mRNA levels in OM and SC adipose depots as well as in liver with the biochemical parameters of the patients included in the study (BMI, glucose, cholesterol and triglycerides). Only the expression levels in the OM location, the most affected one with higher difference between groups, presented a significant correlation with the BMI of the patients (Figure 3).

FASN, *AP2* and *ATGL* mRNA expression in liver and in omental and subcutaneous adipose tissues from lean and obese subjects.

As opposite regulation of *ChREBP* mRNA expression was found in liver and adipose tissues, other markers involved in adipogenesis were checked in these tissues. Thus, the *FASN* mRNA was checked in the three tissues as a measure of lipogenesis. Figure 4A shows the results. As shown, the pattern was very similar to the one for *ChREBP*: obesity doubled hepatic *FASN* mRNA levels, while decreased them to one third in both OM and SC adipose tissues.

The transcripts of AP2, a key mediator of intracellular transport of fatty acids, were also

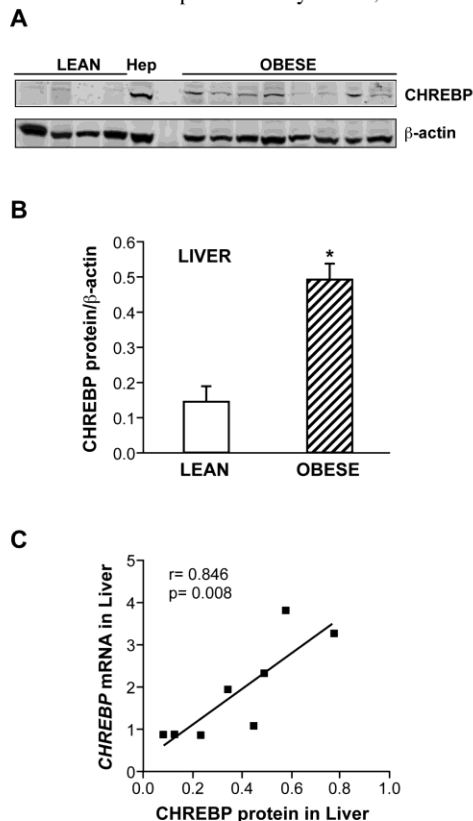


Figure 2. ChREBP mRNA and protein expression in liver of lean and obese subjects. A) Western-blot of ChREBP protein compared to β -actin in liver extracts. A positive control of HepG2 cells extract (Hep) was included. B) Quantification of ChREBP levels compared to β -actin protein expressed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$. C) The correlation between ChREBP protein levels and ChREBP mRNA expression was determined by Pearson's correlation coefficient test (r)

determined and shown in Figure 4B. Although no changes were observed in liver and SC adipose tissue from lean and obese subjects, a significant decrease was seen in OM adipose tissue from obese patients.

When mRNA levels of ATGL, a main lipase involved in lipolysis, were measured, no changes were observed in any of the tissues between lean and obese patients (Figure 4C). Adenyl cyclases (ADCY) are enzymes involved in prior steps of lipolysis. *ADCY3* mRNA levels were measured and are shown in Figure 4D. Meanwhile the hepatic levels did not change with obesity, the expression in both

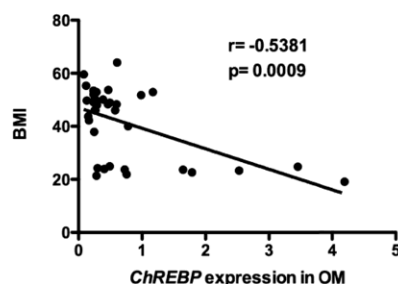


Figure 3. Correlation analysis of BMI and ChREBP mRNA expression in omental adipose tissue determined by Pearson's correlation coefficient test (r).

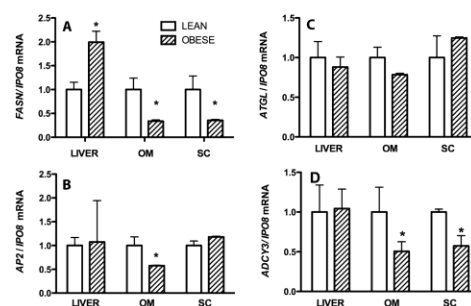


Figure 4. mRNA levels of *FASN* (A), *AP2* (B), *ATGL* (C) and *ADCY3* (D) in liver, omental and subcutaneous adipose tissue of lean and obese subjects. Results are normalized to IPO8 and are mean \pm SEM, * $p < 0.05$ vs its respective lean group.

OM and SC adipose depots were decreased in the obese group.

ChREBP expression during differentiation of preadipocytes.

To further investigate the role of ChREBP in the adipocyte development in humans, we isolated preadipocytes from both OM and SC adipose depots from obese patients. These primary cultures of preadipocytes were differentiated to adipocytes in the presence of 100 nM insulin and harvested at different days (0, 3, 6 and 12 days). Adipocyte differentiation was checked by visual inspection of the accumulated lipids in the cells and by analyzing the expression of well known markers of adipocytic differentiation such as *PPARG* and *AP2*, which increased as expected through adipogenesis (Figure 5, panels A and B). The levels of expression of *ChREBP* mRNA showed dramatic increases at all days tested

and in both OM and SC locations. The pattern was similar in these depots, because the relative fold-change increased at day 3, reached the maximal levels at day 6 and decreased slightly at day 12 of differentiation (Figure 5, panel C). Protein extracts were performed with these differentiated preadipocytes and the levels of ChREBP protein measured by Western blots showed increases in all days when compared to

day 0 of differentiation (Figure 5, panel D). When the differentiation of the cells was performed in the absence of insulin during the last 2 days, a dramatic decrease was observed in *ChREBP*, *AP2* and *PPARG* mRNA expression (not shown), confirming the positive role of insulin on it in human adipocytes.

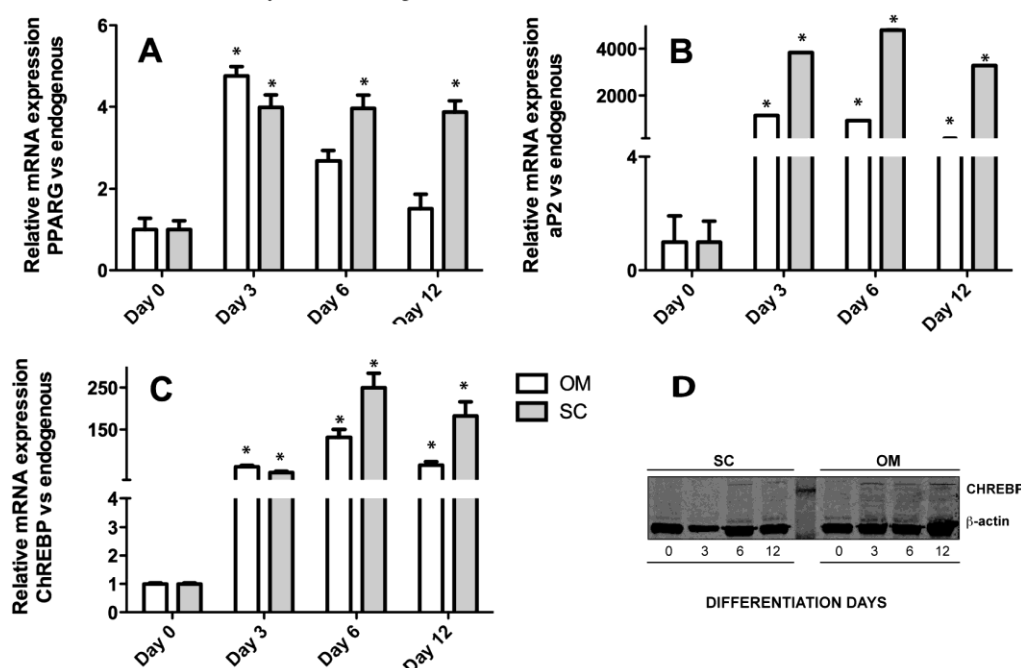


Figure 5. mRNA levels of *PPARG* (A), *AP2* (B) and *ChREBP* (C) and ChREBP protein (D) in omental and subcutaneous preadipocytes at different days of differentiation (0, 3, 6 and 12 days). Results are mean \pm SE from three independent experiments from each depot and are normalized to IPO8. * $p < 0.05$ vs its respective 0 day. A representative Western-blot is shown with ChREBP levels compared to β -actin.

DISCUSSION

ChREBP is a transcription factor with a critical role in the induction of glycolytic and lipogenic genes by glucose, by means of its binding to the ChREs present in the promoters of those target genes which are present, among others, in both liver and WAT. Though there are studies regarding the ChREBP physiological function and activity, very few are found about the transcriptional regulation of the gene. In addition most of them have been performed in mammals others than humans (8-10) and they study almost exclusively the liver. Inactivation of ChREBP causes a complex phenotype which can not be attributed only to changes in the liver, as this protein is expressed in other important tissues. To our knowledge this is the first study

which describes some aspects of ChREBP regulation on human liver in vivo and human differentiated preadipocytes from samples of obese subjects.

ChREBP mRNA expression increased dramatically during the differentiation process of human preadipocytes in culture. Our findings using human preadipocytes are in agreement with the increased *ChREBP* mRNA, obtained during differentiation of murine 3T3 L1 preadipocytes (11). The ChREBP protein levels were also increased in our samples. As other important transcription factors which control adipocyte differentiation and are regulated by insulin and nutrients such as glucose or fatty acids, ChREBP is also regulated by insulin in 3T3L1 preadipocytes

(11). Our results show that during human preadipocytes differentiation, the *ChREBP* transcripts were clearly down-regulated in the absence of insulin during the last 48 hr. Such changes show that the regulation of *ChREBP* mRNA in human differentiated preadipocytes is highly sensitive to the presence of insulin and similar than that obtained in other models such as 3T3L1 which are responsive to insulin stimulation (11).

We further studied the expression of ChREBP in liver and OM and SC adipose tissues of lean and obese subjects. First, we compared mRNA and protein ChREBP levels between liver and adipose tissues of lean individuals, and the amounts tended to be always higher in liver, in agreement with previous results in rats (11, 12). In fact, the protein levels were only detected in the liver but not in the adipose tissues. However, ChREBP protein was clearly detectable in differentiated preadipocytes in contrast to the whole tissue, likely accounting for other cell types present in the tissue which "dilute" the amount of adipocytes. When comparing lean and obese patients, opposite regulation was found in liver and adipose tissue, because while hepatic ChREBP expression increased in obesity, a decrease was observed in both adipose tissues, being the OM location more affected. This result confirms the study by Letexier and coworkers (13)

As stated above, one limitation of our study is the different nature of the tissues studied which could be influencing this regulation in a different way. Adipocytes can represent 70% of the total adipose mass, but only 25% of the cellular population. The other 75% of the cells of the adipose tissue are fibroblasts, macrophages, blood cells, endothelial cells and preadipocytes (14); however, the hepatocytes are the predominant cells (60% of the total number) of the liver and perform the majority of its functions (15). Among SC and OM adipose tissues, there are also morphological and functional differences and, in addition, specifically OM fat (and visceral fat, in general) is clearly associated to increased risks to develop obesity-associated disorders such as metabolic syndrome and insulin resistance. Likely the reduction in the expression of ChREBP in adipose tissue in obesity reflects down-regulation of the pathway leading to lipogenesis to prevent further fat

accumulation and weight gain. Curiously, in our study only the *ChREBP* mRNA expression in the OM adipose tissue, but not the one in liver or SC fat, was negatively correlated to the increasing BMI of the patients. This is in contrast with literature which shows that visceral fat pads were reduced in the *ChREBP* deficient mice (8) and in a similar way, ChREBP inhibition in ob/ob mice reduced considerably the weight of white adipose tissue (10). Although we do not know the reason of this discrepancy, a possible cause might be due to differences among species. Recent reports of species-specificity have been published for another gene, PNPLA3, which is associated to fatty liver in humans but not in mice (16). It has been shown that a high BMI is associated with liver steatosis and that the severity of the steatosis decreases after weight loss (17) and moreover, visceral fat rather than SC fat is a good predictor for the presence of fatty liver (18) due to its contribution through the portal vein. At this respect, several studies in humans and rodents have suggested that ChREBP expression is associated with the excessive accumulation of triglycerides observed in hepatic steatosis (10) which can be caused by an augmented lipogenesis. In fact, all liver samples from the obese subjects in our study show mild to moderate fat infiltration.

In murine hepatocytes it has been shown that ChREBP binds to the ChRE of lipogenic genes promoters as FASN and ACC (19). As expected in our study, the opposite regulation observed in liver and adipose tissue ChREBP mRNA was paralleled by a similar pattern of the lipogenic enzyme FASN. In lean healthy humans, adipose tissue lipogenesis, although active, is less responsive than hepatic lipogenesis to acute or prolonged carbohydrate overfeeding (20). Similar results have been shown in human obesity: there is an enhanced hepatic lipogenesis but no evidence for an increased lipogenic capacity of SC adipose tissue in obese subjects (21). Our study confirms those results and further shows that this occurs not only in adipose tissue from SC origin but also from visceral localization. Although we do not know the exact mechanism of this opposite regulation, it could be due to a different tissue specific regulation of the lipogenic enzymes promoters by ChREBP. That is the case for SREBP-1c, a well established transcription factor which regulates FASN in hepatocytes.

Despite the activation process of SREBP-1c is intact in adipocytes, it does not bind to the functional SRE/E-box site on the FASN promoter in adipocytes (22). This opposite regulation probably takes place because when the adipose tissue expansion limit is reached, adipose tissue stops storing energy efficiently and lipids begin to accumulate in other tissues such as the liver, contributing to lipotoxicity and associated pathologies (insulin resistance, diabetes or fatty liver) (23). In a recent study with adipose tissues from obese subjects we found a generalized decrease in the expression of enzymes involved in lipogenesis, as well as in lipolysis, (24), both likely due to a defense mechanism. Regarding lipolysis, the mRNA expression of two enzymes, ADCY3 and ATGL, were assayed in the liver and adipose tissues samples of our present study. No changes were observed in the tisular expression levels of ATGL between lean and obese subjects, however, ADCY3 expression decreased in adipose tissue of OM and SC origin, while no differences were seen in the liver. These data are in agreement with previous results, as *ATGL* mRNA levels were found to be unaffected in obesity (25) (26) and four isoforms of ADCY, ADCY3 included, were decreased in adipose tissue of obese subjects (24). Adipocytes release fatty acids into the circulation when nutrients are needed but an obese state would not be a situation in which energy expenditure were required. Thus, lipolysis in these tissues of obese patients could be inhibited to avoid a higher excess of free fatty acids. Among fatty acids, polyunsaturated fatty acids (PUFA) are potent inhibitors of lipogenesis by downregulating *ChREBP* gene expression (27). In situations in which lipolysis is high, there is a selective mobilization of polyunsaturated fatty acids (PUFA) to circulation (28), if lipolysis were inhibited in some way, mobilization of PUFA would be also decreased with its accumulation inside the adipocytes. This might be happening in the adipose tissue of the obese patients of our study, and this putative increase in adipose tissue PUFA could be suppressing lipogenic enzymes by inhibiting ChREBP expression. In addition, a decrease of AP2 could reduce NEFA release, in that case in absence of AP2, lipolysis would decrease and the NEFA (and concomitantly PUFA) content inside the adipocyte could increase up to 3-fold (29). On the other hand, hepatic PUFA are clearly

decreased in the liver of obese patients with steatosis (30), and this decrease might accomplish for the higher levels of hepatic *ChREBP* mRNA, as the inhibition by PUFA could be abolished.

In conclusion, the present study shows for the first time the presence of ChREBP expression in human differentiated preadipocytes but an opposite regulation of that expression in the liver and adipose tissue from obese subjects. These results are compatible with a limited lipogenic/adipogenic capacity in adipocytes which might lead to spillover of lipids excess to other tissues such as the liver with an increased lipogenesis contributing to lipotoxicity and comorbidities found in obese patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Fundación Médica Mutua Madrileña (2006) and Plan Nacional: SAF 2006-01319 and 2009-09364 to MJO.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES.

1. Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* 2008; **34**: 643-648.
2. Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 13656-13661.
3. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, *et al.* A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 9116-9121.
4. Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J* 2008; **55**: 617-624.
5. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 2004; **53**: 632-637.
6. Samuels HH, Stanley F, Casanova J. Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. *Endocrinology* 1979; **105**: 80-85.

7. Hurtado del Pozo C, Calvo RM, Vesperinas-Garcia G, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, Corripio-Sanchez R, *et al.* IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 2010; **18**: 897-903.
8. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 7281-7286.
9. Iizuka K, Miller B, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; **291**: E358-364.
10. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, *et al.* Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006; **55**: 2159-2170.
11. He Z, Jiang T, Wang Z, Levi M, Li J. Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **287**: E424-430.
12. Letexier D, Peroni O, Pinteur C, Beylot M. In vivo expression of carbohydrate responsive element binding protein in lean and obese rats. *Diabetes Metab* 2005; **31**: 558-566.
13. Letexier D, Pinteur C, Large V, Frering V, Beylot M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res* 2003; **44**: 2127-2134.
14. Fruhbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol* 2008; **456**: 1-22.
15. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; **161**: III-XIII, 1-151.
16. Chen W, Chang B, Li L, Chan L. Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology* 2010; **52**: 1134-1142.
17. Luyckx FH, Desai C, Thiry A, Dewe W, Scheen AJ, Gielen JE, *et al.* Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; **22**: 222-226.
18. Fan JG, Farrell GC. VAT fat is bad for the liver, SAT fat is not! *J Gastroenterol Hepatol* 2008; **23**: 829-832.
19. Ishii S, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 15597-15602.
20. Diraison F, Yankah V, Letexier D, Dusserre E, Jones P, Beylot M. Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res* 2003; **44**: 846-853.
21. Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **282**: E46-51.
22. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Nakagawa Y, Takahashi H, *et al.* SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res* 2007; **48**: 1581-1591.
23. Danforth E, Jr. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nat Genet* 2000; **26**: 13.
24. Hurtado Del Pozo C, Calvo RM, Vesperinas-Garcia G, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, Rubio MA, *et al.* Expression Profile in Omental and Subcutaneous Adipose Tissue from Lean and Obese Subjects. Repression of Lipolytic and Lipogenic Genes. *Obes Surg* (in press); e-pub ahead of print 5 August 2010; doi:10.1007/s11695-010-0246-4.
25. Mairal A, Langin D, Amer P, Hoffstedt J. Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia* 2006; **49**: 1629-1636.
26. Langin D, Lucas S, Lafontan M. Millennium fat-cell lipolysis reveals unsuspected novel tracks. *Horm Metab Res* 2000; **32**: 443-452.
27. Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2843-2854.
28. Raclot T. Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 2003; **42**: 257-288.
29. Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 1999; **40**: 967-972.
30. Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, Poniachik J, Csendes A, Maluenda F, *et al.* Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 2007; **15**: 24-31.

4. DISCUSIÓN

La prevalencia de obesidad aumenta rápidamente en la mayor parte de los países, alcanzando proporciones epidémicas, especialmente en aquellos que han cambiado sus hábitos hacia una forma de vida occidental (Friedman, 2000) por lo que es necesario poseer un mayor conocimiento a nivel genético de esta enfermedad. La utilización de herramientas de alto rendimiento como son los microarrays nos permiten adquirir este conocimiento genético, con la ventaja de poder obtener un patrón de expresión alterado de miles de genes que nunca antes habían sido asociados a la patología en estudio. Sin embargo, esta tecnología también puede ser aplicada para identificar genes de expresión estable que sirvan de control al usar PCR a tiempo real. A diferencia del Northern blot o PCR a tiempo real, los microarrays comparan una gran cantidad de genes en dos condiciones diferentes, por lo que no es necesario genes referencia para su normalización. La identificación de nuevos genes referencia por microarrays, dentro de un tejido, se ha demostrado como la estrategia más adecuada para la búsqueda de genes estables (Lee et al., 2002).

Los genes referencia son claves y determinantes en el análisis de la expresión génica ya que constituyen el método de normalización más común (de Jonge et al., 2007). En concreto, el tejido adiposo es un órgano muy regulado metabólicamente. La literatura describe algunos genes referencia que son regulados bajo estimulación hormonal o durante la diferenciación adipogénica, este es el caso de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), beta-actina (ACTB) o 18S (Bustin, 2002; Schmittgen and Zakrajsek, 2000; Suzuki et al., 2000). Aunque hay resultados controvertidos, el uso del 18S plantea varios inconvenientes, por un lado muestra cierta resistencia a la degradación en comparación con otros mensajeros (Vandesompele et al., 2002), su expresión se ve alterada en ciertas situaciones como factores biológicos o tratamiento con drogas (Johnson et al., 1995; Spanakis, 1993) y además existe un desequilibrio entre mensajero (Solanas et al., 2001) y fracción ribosomal, con diferentes polimerasas involucradas en su transcripción (Radonic et al., 2004). ACTB y GAPDH también han sido extensamente utilizados como genes referencia. En tejido adiposo, ACTB es regulado por dietas hipocalóricas (Gabrielsson et al., 2005) mientras que GAPDH es muy sensible a cualquier perturbación de la homeostasis celular o manipulación experimental (Ke et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Zhu et al., 2001). Debido a esta regulación del tejido adiposo, resulta importante elegir un buen gen control que permita un adecuado análisis de la expresión génica.

En esta tesis doctoral, se realizó un estudio sobre la búsqueda del gen referencia más adecuado en tejido adiposo SC y OM así como en cultivo de preadipocitos humanos a distintos días de diferenciación y bajo diferentes estímulos hormonales mediante el uso de microarrays de ADN y métodos estadísticos. La Importina 8 (IPO8) fue el gen referencia más idóneo en el estudio de la

expresión génica en tejido adiposo SC y OM y en preadipocitos humanos. IPO8 pertenece a la familia de las β -importinas, proteínas nucleares involucradas en el transporte nuclear y ha sido propuesto previamente en otros trabajos como gen referencia en distintas regiones cerebrales de individuos control y con alcoholismo crónico (Johansson et al., 2007), en muestras de pulmón (Nguewa et al., 2008), y más recientemente en muestras de colon (Sorby et al., 2010) o gliomas (Kreth et al., 2010).

Hasta la fecha existen cuatro estudios realizados en tejido adiposo humano incluyendo el presentado en esta tesis doctoral (Catalan et al., 2007; Gabrielsson et al., 2005; Hurtado del Pozo et al., 2010; Mehta et al., 2010) y dos en cultivos de preadipocitos humanos (Gorzelnia et al., 2001; Hurtado del Pozo et al., 2010) cuyo objetivo fue encontrar el gen referencia más adecuado para la normalización de la PCR a tiempo real. Algunos de nuestros resultados difieren con los obtenidos en estos estudios, debido posiblemente a un abordaje experimental distinto ya que somos los únicos que validamos 16 genes referencia tanto en tejido adiposo OM y SC como en preadipocitos humanos, y buscamos mediante microarrays posibles candidatos a gen control. Se ha demostrado que la expresión de estos genes puede variar dependiendo del tejido y el estado fisiológico. La necesidad de encontrar un gen referencia apto para estas validaciones ha permitido el desarrollo de varios algoritmos matemáticos cuyo objetivo es determinar su estabilidad. Los más utilizados son *GeNorm* (Andersen et al., 2004), *Normfinder* (Vandesompele et al., 2002) y *Bestkeeper* (Pfaffl et al., 2004). *GeNorm* es el software más utilizado para validar genes referencia y utiliza los parámetros M (promedio de estabilidad de la expresión) y V (variación por parejas). Una M baja indica una expresión estable y en consecuencia un posible candidato a gen control. Otra característica de *GeNorm* es que no requiere una distribución normal de los datos, aunque este algoritmo tiene como desventaja que determina la estabilidad de la expresión (M) mediante la comparación en pareja de uno de los candidatos referencia y el resto. Esto puede dar lugar a una co-regulación de los genes candidatos y en consecuencia una disminución de la eficiencia de este algoritmo. Para solventar este problema se propuso un nuevo modelo, *NormFinder*. Este algoritmo ordena los genes referencia candidatos dependiendo de la variación intra-grupos e intergrupos, de manera que evita así una posible influencia de co-regulación. En nuestro trabajo utilizamos el coeficiente de variación (CV), *Normfinder* y *GeNorm* para evaluar la estabilidad de los 16 genes control en tejido adiposo OM y SC. En cada uno de los análisis estadísticos IPO8 se encontraba entre los tres genes más estables. Mehta *et al.*, también utilizaron *GeNorm* y *Normfinder* e incluyeron en el estudio *Bestkeeper* (Mehta et al., 2010), pero a diferencia de nuestro análisis sólo realizaron el estudio en muestras de tejido OM de pacientes obesos y obesos con hígado graso, por lo que la variable se reducía sólo al hígado graso. Aparte de la IPO8, quisimos buscar nuevos

genes referencia en tejido adiposo tanto OM como SC de pacientes obesos y delgados mediante el uso de los microarrays de ADN. Aunque el uso de microarrays, tiene como objetivo encontrar una expresión diferencial en dos condiciones experimentales distintas, los datos de expresión obtenidos también pueden ser usados para la identificación de los genes más estables en distintas condiciones (Lee et al., 2002). En nuestro estudio obtuvimos que el gen FBXL10 era el más estable en tejido adiposo SC y OM de pacientes obesos y delgados. FBXL10 es un gen altamente conservado que codifica para una proteína nuclear encargada de regular la transcripción de genes ribosomales (Frescas et al., 2007). Por sus características, este gen podría comportarse como un buen gen control, ya que es ubicuo y además posee una función importante para el mantenimiento celular. Gabrielsson et al también realizaron un filtrado de genes en un microarray en tejido adiposo SC y OM de pacientes con distinto IMC y con distintas dietas (Gabrielsson et al., 2005). El gen estable que obtuvieron fue el receptor de lipoproteína de baja densidad relacionado con proteína 10 (LPR10). LPR10 no poseía una expresión estable en nuestro microarray.

Una vez que se obtuvo por un lado, un posible nuevo gen referencia candidato, FBXL10, y por otro lado IPO8 tras los análisis estadísticos, evaluamos la estabilidad de ambos genes junto con 18S, el gen control más utilizado en la bibliografía. Se llevó a cabo una normalización de la expresión de los genes más comunes tanto en obesidad como en la fisiología del adipocito, leptina, adiponectina e interleukina 6 con cada uno de los genes, IPO8, FBXL10 y 18S. El mejor candidato fue IPO8 en los tres casos.

También se evaluó la estabilidad de FBXL10 e IPO8 en cultivos de preadipocitos humanos con distintos tratamientos hormonales así como a lo largo de la diferenciación del adipocito. Ambos genes mostraron un CV bajo, apto para un buen gen referencia en los distintos tratamientos. Puesto que en otro estudio de similares características, en preadipocitos humanos y bajo distintos tratamientos hormonales, propusieron GAPDH como gen referencia (Gorzelnia et al., 2001), lo incluimos en el estudio de diferenciación de preadipocitos humanos y lo comparamos con la estabilidad de IPO8 y FBXL10 a distintos días de diferenciación. GAPDH presentó una gran variabilidad en los días 6 y 12 tanto en preadipocitos OM como SC. En contraste a lo publicado por Gorzelnia et al en preadipocitos humanos a distintos días de diferenciación, y consistente con resultados previos publicados tanto en tejido adiposo (Barroso et al., 1999; Liu et al., 2003; Rolland et al., 1995) como en otros tejidos o en cultivos celulares (Alexander et al., 1988; Dugail et al., 1988; Nasrin et al., 1990; Radonic et al., 2004; Roche et al., 1997; Suzuki et al., 2000; Zhong and Simons, 1999; Zhu et al., 2001), GAPDH no es un buen gen control a utilizar en estudios de expresión génica.

Tras este estudio de búsqueda del gen referencia más adecuado en tejido adiposo SC y OM y preadipocitos, escogimos IPO8 como gen control en todos nuestros análisis posteriores de expresión génica ya que estudiamos tanto muestras de tejido obtenido *in vivo* como procedente de cultivos *in vitro*.

Análisis de la expresión génica de tejido adiposo SC y OM en obesidad mórbida mediante el uso de microarrays de ADN

En esta tesis doctoral se analizó el perfil de expresión génica de pacientes obesos mórbidos mediante el uso de microarrays de ADN utilizando tejido adiposo SC y OM y comparándolo con el OM y SC de pacientes delgados. De las 32.878 sondas que correspondían a 29.098 genes, 545 aumentaron su expresión de forma significativa en tejido adiposo OM y 47 genes en tejido adiposo SC de obesos. El número de genes en los que se encontró una inhibición de la expresión en obesos fue de 723 genes en tejido adiposo OM y 27 genes en tejido adiposo SC. Un 40% de genes con expresión alterada tienen función biológica desconocida. La proporción de genes alterados es de un 4.3% en tejido adiposo OM, bastante similar a otros artículos ya publicados (Baranova et al., 2005) y 0,25% en tejido adiposo SC. Ésta puede resultar pequeña si comparamos con otros arrays realizados en este depósito (Shea et al., 2009). Sin embargo, esta discrepancia podría deberse al uso de muestras de un único sexo en el análisis. La distribución de tejido adiposo difiere entre mujeres y hombres, siendo más abundante la obesidad visceral en hombres que en mujeres (Kissebah and Krakower, 1994), pero dejando al margen la obesidad, en individuos delgados se ha visto que hay un dimorfismo sexual entre los depósitos de tejido adiposo (Sparks et al., 2009). Por esta razón el utilizar un solo sexo en un análisis de microarrays puede darnos unos resultados sesgados. Además, las diferencias técnicas entre las distintas plataformas hacen que los trabajos varíen de unos a otros, lo que dificulta la comparación de los resultados entre los mismos.

En cuanto a las diferencias entre depósitos, cabía esperar que el número de genes alterados en el tejido adiposo OM fuera mayor que en el tejido adiposo SC puesto que el tejido adiposo OM tiene una fuerte correlación con el riesgo metabólico (Fox et al., 2007; Goodpaster et al., 2005; Pou et al., 2009) mientras que el tejido adiposo SC no sólo no posee ninguna asociación, sino que puede tener propiedades protectoras (Snijder et al., 2003). No se sabe la razón por la cual el tejido adiposo SC tiene estas propiedades. La asociación entre riesgo metabólico y tejido adiposo OM está algo más estudiada y se han propuesto cuatro posibles mecanismos que explican esta relación (Harris and Leibel, 2008): (1) la proximidad del tejido adiposo OM con la vena porta hace pensar en un efecto metabólico directo sobre el hígado; (2) las características celulares autónomas de

cada tejido, es decir, que el preadipocito que pertenece al tejido adiposo OM o SC posee características propias y dependientes de la localización anatómica; (3) el incremento de la grasa OM produce un estrés fisiológico que causa riesgos metabólicos; (4) la limitada capacidad de almacenamiento del tejido adiposo SC que provocaría un aumento en el tamaño del tejido adiposo OM así como una deposición ectópica de ácidos grasos en el hígado o músculo. Estas cuatro posibilidades no son mutuamente excluyentes sino que deben ser entendidas de forma conjunta para entender la compleja asociación de los depósitos y su riesgo metabólico (Klein et al., 2007).

El análisis de la expresión génica diferencial de estos dos depósitos, en condiciones de obesidad, nos ayuda a esclarecer posibles causas de asociaciones metabólicas entre depósitos. Pero no sólo se han encontrado diferencias en las proporciones de genes alterados entre los depósitos sino que como muestran otros estudios (Zhang et al., 2007) los procesos biológicos y las vías afectadas son diferentes en ambas localizaciones.

Las alteraciones en la expresión génica no sólo se manifiestan a nivel de genes individuales, sino también de forma más amplia afectando a rutas de señalización o grupos funcionales de genes. En tejido adiposo OM, los genes con expresión génica aumentada se agrupan principalmente en procesos de inmunidad y defensa, señal transduccional y metabolismo proteico, mientras que los reprimidos se agrupan en estos dos últimos y en metabolismo de los ácidos nucleicos. En el tejido SC encontramos una gran diferencia entre los procesos biológicos afectados con respecto al OM, sin embargo son coincidentes en los principales procesos en los que se agrupan los genes con expresión aumentada, en inmunidad y defensa, junto con señal de transducción. El aumento de genes en procesos de inmunidad y defensa en obesidad coincide con la mayoría de los análisis de expresión realizados con microarrays en otros estudios (Cancello et al., 2005; Gabrielsson et al., 2003; Gomez-Ambrosi et al., 2004; Liu et al., 2009; Vohl et al., 2004) ya que el grado de obesidad correlaciona con el grado de inflamación del tejido adiposo, sobre todo en el depósito OM. Esta asociación puede explicarse mediante las teorías de la expansibilidad y grado de inflamación ya que cuando el tejido adiposo supera el límite de almacenamiento, el adipocito aumenta de tamaño alterando la secreción de citoquinas, predominando las citoquinas pro-inflamatorias frente a las antiinflamatorias y secretando más sustancias quimio-atrayentes que provocan la infiltración de macrófagos (Harman-Boehm et al., 2007; O'Rourke et al., 2009; Skurk et al., 2007)

Si atendemos a la magnitud del cambio de los genes que aumentan su expresión, tanto en SC como en OM, la calgranulina B (S100A9) fue el gen con mayor nivel de cambio del estudio, perteneciendo al proceso biológico de inmunidad y defensa. Esta molécula inflamatoria se ha

propuesto como un nuevo marcador cardiovascular en diabetes tipo 1, pertenece a la familia de proteínas S100 moduladas por calcio, que controlan la inflamación vascular y la aterotrombosis (Averill et al., 2011a, b; Johansson et al., 2008). Estas proteínas se inducen durante la diferenciación de preadipocitos murinos 3T3-L1 y son liberadas al medio cuando son tratadas con hormonas lipolíticas y ácidos grasos (Kato et al., 1988). S100A9 forma un heterodímero junto con otra molécula de la misma familia (S100A8) llamado calprotectina, ambas son abundantes en plasma en estados de inflamación como la obesidad o la diabetes tipo 2 (Mortensen et al., 2009) y forman parte de varios procesos en la respuesta inmune como la adhesión celular, quimiotaxis y actividad antimicrobiana (Striz and Trebichavsky, 2004). En cuanto al grupo de genes con baja expresión, NDRG4 (N-Myc downstream-regulated gene 4) fue común en ambos tejidos. Se trata de un miembro de la familia "N-Myc *downregulated*" el cual pertenece a la superfamilia de hidrolasas alfa/beta. La proteína que codifica este gen es una proteína citoplasmática involucrada en la regulación de la señalización celular mitogénica de células vasculares (Nishimoto et al., 2003) y que recientemente ha sido identificada como nuevo gen supresor de tumores en cáncer colorrectal (Melotte et al., 2009). Su relación con la obesidad no ha sido aún descrita, pero nuestros datos coinciden con otro estudio realizado en tejido adiposo SC de pacientes obesos y delgados, donde NDRG4 aparece también como uno de los genes de expresión disminuida en obesidad (Shea et al., 2009).

El principal objetivo de los estudios con arrays no es sólo el análisis comparativo del perfil de expresión génica, sino la interpretación de los genes alterados dentro del contexto biológico en estudio. Esta tesis doctoral se centró en el estudio del proceso biológico del metabolismo de los ácidos grasos. Este proceso no es el que más genes agrupa, ni el que posee genes con mayor nivel de expresión en el análisis de microarrays, pero es único y clave en la fisiología del adipocito. El tejido adiposo es un tejido muy heterogéneo, compuesto por un 50%-70% de adipocitos maduros, un 20%-40% de células del estroma vascular (preadipocitos, fibroblastos, y células mesenquimales no diferenciadas) y un 1%-30% de macrófagos (Hauner, 2005). Este conjunto de células son analizadas en el microarray y no se sabe en qué proporción contribuyen al perfil de expresión que se presenta en este trabajo, por esta razón se seleccionó el proceso de metabolismo de los ácidos grasos como un proceso debido más a la alteración de la expresión génica del adipocito que a otro tipo celular. Dentro del metabolismo de los ácidos grasos, se seleccionaron 28 genes con expresión diferencial en el microarray, los cuales pertenecían a factores de transcripción, enzimas del metabolismo energético, del metabolismo de ácidos grasos, del colesterol así como proteínas de cascadas de señalización. Esta selección de genes se validó con un mayor número de muestras de pacientes obesos por el método más sensible y específico de

medición en el cambio de la expresión de un gen, la técnica de PCR a tiempo Real con sondas Taqman específicas.

Validación de microarrays: Inhibición de la expresión de genes lipolíticos y lipogénicos.

La validación de los 28 genes seleccionados mediante PCR a tiempo real confirmó en su mayoría los datos obtenidos en los microarrays. Como se ha mencionado anteriormente, estos 28 genes se engloban dentro del proceso del metabolismo lipídico, concretamente en el análisis de la expresión génica de la vía lipogénica y lipolítica. Mientras que la regulación de estas vías ha sido ampliamente estudiada a nivel nutricional, poco se conoce de la base transcripcional por la cual el adipocito almacena TG o los libera al torrente sanguíneo (Eguchi et al., 2011). Tanto en el microarray como posteriormente en la validación por PCR a tiempo real, se encontró en ambos depósitos OM y SC una inhibición generalizada de la expresión de los genes implicados en lipólisis y lipogénesis siendo más pronunciado el cambio en el tejido adiposo OM. La causa de esta diferencia entre depósitos se debe a que el tejido adiposo OM posee características morfológicas y funcionales diferentes del tejido adiposo SC, incluyendo desigualdades en la regulación de la lipólisis bajo la acción de la insulina (Giorgino et al., 2005). La insulina ejerce una inhibición más débil de la lipólisis en adipocitos aislados de tejido adiposo OM a diferencia de SC (Zierath et al., 1998), mientras que las catecolaminas por el contrario estimulan más la lipólisis en adipocitos de tejido adiposo OM (Arner, 1999). En cuanto a la inhibición de la lipogénesis, existen estudios *in vitro* (Cifuentes et al., 2008) en los que se muestra una menor actividad lipogénica de adipocitos aislados de tejido adiposo OM de pacientes obesos.

• Regulación transcripcional de lipogénesis en hígado y tejido adiposo

A nivel transcripcional y centrándonos en los resultados obtenidos en la vía lipogénica, encontramos que enzimas clave como FASN y ACACB (acetil carboxilasa 2) se encuentran inhibidas en obesidad bloqueando la síntesis de triglicéridos, lo que nos sugiere un mecanismo de respuesta del organismo al exceso de ácidos grasos (Poulain-Godefroy et al., 2008). La enzima ACACB cataliza la formación de malonil coenzima A, un sustrato esencial para el sistema de elongación y para la enzima FASN (Brownsey et al., 2006). FASN desempeña un papel muy importante en el desarrollo de la obesidad y en la regulación del peso corporal (Mobbs and Makimura, 2002) siendo la enzima central de la lipogénesis *de novo*, al catalizar la conversión de malonil Coenzima A a palmitato. Los cambios en la actividad de esta enzima se deben a la modificación de su transcripción (Claycombe et al., 1998; Jones et al., 1997; Wang et al., 2004). La

represión de esta enzima disminuye el peso corporal en roedores, aumenta la beta oxidación de los ácidos grasos y disminuye el apetito sugiriendo así que pueda actuar como un regulador de la homeostasis energética (Kumar et al., 2002; Loftus et al., 2000; Mobbs and Makimura, 2002). Existen estudios previos en los que se ha analizado la expresión génica de enzimas lipogénicas en tejido adiposo humano y que corroboran nuestros resultados (Diraison et al., 2002; Hudgins et al., 2008; Minchira et al., 2004; Ortega et al., 2010; Swierczynski et al., 2003) sin embargo en contraste con lo publicado Berndt et al. encontraron un incremento tanto de ARNm como de la proteína FASN en tejido adiposo de pacientes obesos (Berndt et al., 2007). Las diferencias entre estos estudios se pueden deber al diferente grado de obesidad de los pacientes. En un primer momento el tejido adiposo puede almacenar rápidamente una gran cantidad de TG aumentando la capacidad lipogénica, sin embargo, puede llegar un momento en el que el tejido adiposo disminuya la expresión de genes lipogénicos (Poulain-Godefroy et al., 2008) con el objetivo de no acumular más ácidos grasos a modo de mecanismo de defensa. Con respecto a esta teoría, Nadler et al. (Nadler and Attie, 2001) propusieron una idea similar en la que el tejido adiposo tiene una capacidad de almacenamiento limitada, de manera que cuando se alcanza, los adipocitos reducen su disposición a sintetizar ácidos grasos. Otras posibles causas que puedan explicar estas diferencias entre los trabajos publicados, son las diferencias nutricionales de cada población o el estado de inflamación de cada muestra (Berndt et al., 2007).

Como se señaló en la introducción, la regulación de la vía lipogénica se produce a nivel transcripcional principalmente a través de dos factores de transcripción: SREBP1c y ChREBP (Dentin et al., 2005b). Ambos factores al igual que las enzimas lipogénicas están inhibidos tanto en tejido adiposo SC como OM de pacientes obesos.

Enzimas clave como FASN y ACC requieren de ambos factores para estar completamente activadas (Dentin et al., 2005a; Ferre and Foulfelle, 2007). SREBP1c ha sido ampliamente estudiado en hígado y en tejido adiposo. Este factor de transcripción media la acción de la insulina regulando la transcripción de proteínas como FASN, LPL o leptina (Boizard et al., 1998; Kim et al., 1998a; Latasa et al., 2000). Al igual que en nuestros resultados, Kolehmainen et al. encontraron una disminución de su expresión en tejido adiposo OM, recuperándose el nivel de mensajero tras la cirugía bariátrica (Kolehmainen et al., 2001). Sin embargo, se ha visto que la actividad de SREBP-1c por sí sola no estimula completamente los genes lipogénicos en respuesta a carbohidratos, ya que la delección del gen en ratón sólo redujo un 50% la síntesis de ácidos grasos (Liang et al., 2002), lo que evidencia que la insulina por sí sola no es capaz de inducir los genes lipogénicos, siendo necesario un regulador adicional: el ChREBP. Poco se sabe de este factor a nivel transcripcional, ya que la mayoría de los estudios publicados hasta el momento se

han centrado en la función fisiológica y el mecanismo de acción de ChREBP. Además la mayoría de estas publicaciones se han realizado en ratón (Dentin et al., 2006; Iizuka et al., 2004; Iizuka et al., 2006) estudiando sobre todo la función que desempeña en el hígado. Por ello en esta tesis doctoral se presenta el primer estudio que describe algunos aspectos de la regulación de ChREBP en hígados de pacientes con obesidad mórbida y en preadipocitos humanos aislados de pacientes obesos.

Para conocer el potencial de ChREBP en la fisiología del adipocito evaluamos a distintos días de diferenciación el nivel de ARNm y proteína en preadipocitos humanos aislados diferenciados a partir de sus precursores de tejido adiposo OM y SC de pacientes obesos, encontrando un marcado aumento a partir del tercer día de diferenciación, siendo máximo tanto en preadipocitos SC como OM a día 6 y 12. Nuestros resultados confirmaron el estudio previo realizado en la línea celular de preadipocitos murinos y preadipocitos 3T3-L1 (He et al., 2004). Se ha descrito en hepatocitos murinos (Dentin et al., 2004), células beta (Davies et al., 2008) y 3T3-L1, que el ChREBP está altamente regulado por glucosa, incrementando su expresión a nivel del ARNm y de proteína al aumentar la concentración de glucosa en el medio. Nuestros resultados no fueron concluyentes cuando se sometieron los preadipocitos humanos a diferentes concentraciones de glucosa, sin embargo al evaluar el efecto de la insulina a nivel de ARNm en distintos días de diferenciación durante 48 horas con y sin insulina, la expresión de ChREBP se vio fuertemente modificada. Tales cambios indican una alta sensibilidad de ChREBP a la presencia o ausencia de insulina, como ocurre con la mayoría de factores de transcripción involucrados en la diferenciación del adipocito, como es el caso de SREBP1c y PPARG (He et al., 2004).

De los resultados obtenidos, se desprende que, el tejido adiposo en condiciones de obesidad disminuye la expresión de genes lipogénicos, tanto enzimas como factores de transcripción, lo que provoca que los ácidos grasos sean almacenados de forma ectópica en otros tejidos y órganos. El hígado es uno de los primeros órganos afectados y es responsable del almacenamiento lipídico en estas condiciones, por ello el 70 % de los obesos posee hígado graso (Hamaguchi et al., 2005). El hígado en condiciones de obesidad, al contrario que el tejido adiposo, aumenta su capacidad lipogénica incrementando la transcripción de genes como FASN o SREBP1c en el caso de ratones genéticamente obesos (Shimomura et al., 1999). En humanos quisimos estudiar la expresión de ChREBP en hígado y compararlo con la expresión en tejido adiposo SC y OM de pacientes delgados y obesos. Como cabía esperar y confirmando estudios en rata (He et al., 2004; Letexier et al., 2005) el nivel de ARNm y sobre todo de proteína (indetectable en tejido adiposo) fue mayor en hígado cuando lo comparamos con tejido adiposo de pacientes delgados. Cuando se comparó la expresión de ChREBP en hígados de pacientes

delgados y obesos, tanto el ARNm como la proteína aumentaron significativamente. Para confirmar el aumento de la capacidad lipogénica en estas muestras de hígado, además medimos el nivel de ARNm de FASN, confirmando nuevamente el aumento de marcadores lipogénicos en hígado, en contraposición a la disminución observada en tejido adiposo tanto SC como OM de obesos mórbidos.

La inhibición de la expresión de los genes lipogénicos en tejido adiposo que nosotros observamos y que previamente había sido sugerida por otros (Diraison et al., 2002; Hoffstedt et al., 2007; Roberts et al., 2009) puede explicarse como una adaptación fisiológica del adipocito al almacenamiento descontrolado de lípidos para prevenir la acumulación de una mayor cantidad de grasa y en consecuencia ganancia de peso (ver figura 7). Curiosamente encontramos una correlación inversa entre el nivel de ARNm de ChREBP en tejido adiposo OM y el IMC. Una correlación similar fue encontrada por Roberts *et al.*, (Roberts et al., 2009) entre la expresión de genes asociados con lipogénesis *de novo* y tamaño del adipocito e IMC.

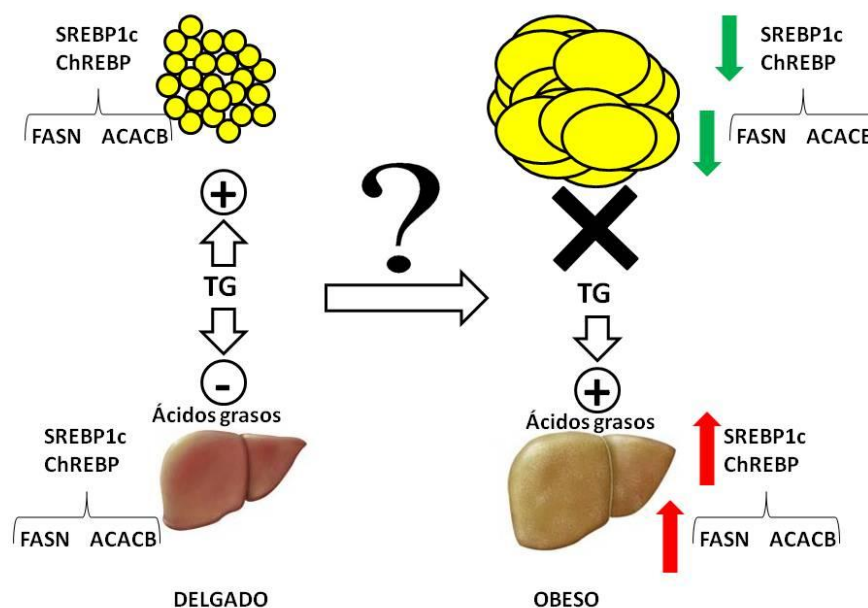


Figura 7. Inhibición de la expresión de genes lipogénicos en tejido adiposo y aumento de la expresión en hígado

Se desconoce el mecanismo por el cual el tejido adiposo y el hígado poseen una regulación de la lipogénesis opuesta. Una posible hipótesis puede ser la regulación de ChREBP y SREBP1c, por ácidos grasos polinsaturados (PUFA). Dentro de los ácidos grasos, los PUFA son potentes inhibidores de la lipogénesis, actuando a través de ChREBP (Dentin et al., 2005a) y SREBP1c. En situaciones en las que hay una lipólisis alta, existe una movilización selectiva de PUFA al

torrente sanguíneo (Raclot, 2003), si la lipólisis disminuye, como ocurre de manera generalizada en tejido adiposo de obesos, podría darse un acúmulo de PUFA dentro del adipocito que inhibiría la expresión de ChREBP y SREBP1C, y consecuentemente la de enzimas lipogénicas. Además quisimos ver la expresión de la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4 o AP2) que permite la liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo tanto en hígado como en tejido adiposo. Sólo en tejido adiposo OM vimos una disminución significativa de la expresión de AP2. Está descrito que, en ausencia de AP2, la cantidad de ácidos grasos liberados (y en consecuencia PUFA) al torrente sanguíneo disminuye, aumentando hasta tres veces sus niveles en el interior del adipocito (Coe et al., 1999). En cambio, en pacientes obesos con esteatosis hepática se ha encontrado una disminución de PUFA en el hígado (Elizondo et al., 2007), por lo que no se produciría la inhibición de ChREBP y SREBP1c, y podría explicar su aumento en este tejido.

• Regulación transcripcional de la lipólisis en tejido adiposo de obesos mórbidos

La lipólisis es la vía catabólica que permite la hidrólisis de TG almacenados en el adipocito, con la consecuente liberación de NEFA y glicerol. En condiciones de obesidad, aunque el tejido adiposo puede variar hasta 10 veces en masa, la concentración de NEFA sólo aumenta como máximo el doble (McQuaid et al., 2011). Esta observación implica claramente la existencia de una restricción en la liberación de NEFA en individuos obesos. A nivel transcripcional, también se han descrito bajos niveles de ARNm en las enzimas principales de lipólisis, como LPL (Ong and Kern, 1989), HSL y ATGL (Jocken et al., 2007). En los resultados obtenidos en el array no aparecieron ninguna de estas tres lipasas, pudiendo deberse al filtrado de las sondas, sin embargo sí que aparecieron otros genes con expresión inhibida involucrados en la cascada de señalización de la lipólisis así como moduladores y estimuladores de esta vía como son las adenilato ciclasas, el factor de fragmentación del ADN que induce muerte celular o CIDEA (*cell death-inducing ADN fragmentation factor-like effector A*) y el AZGP1 (Glicoproteína 2 alfa zinc, *Zinc-alpha-2-glycoprotein*) respectivamente.

Las adenilato ciclasas catalizan la conversión de ATP a AMPc, una importante molécula en la transducción de la señal en eucariotas, que regula procesos fisiológicos en mamíferos, incluyendo la lipólisis. Existen 9 tipos de adenilato ciclasas, pero sólo ADY1, ADY2, ADY3 y ADY4 disminuyeron su nivel de ARNm en tejido adiposo OM de obesos tanto en microarrays como en la consiguiente validación. ADY3 también vio disminuida su ARNm en tejido adiposo SC. Hasta el momento las isoformas en tejido adiposo humano no han sido estudiadas en profundidad, sin embargo existen publicaciones que muestran la importancia de estas proteínas señalizadoras en el desarrollo de la obesidad. En cultivo de preadipocitos de rata,

se ha descrito una expresión distinta de las diferentes isoformas, así mientras que ADCY2 está presente en preadipocitos no diferenciados, las isoformas más abundantes en adipocitos maduros son las isoformas ADYC5 y 6 (Serazin-Leroy et al., 2001). Recientemente se han publicado varios trabajos que sugieren la asociación de ADYC3 y ADYC5 con la regulación del peso corporal en una población sueca (Nordman et al., 2008) y diabetes tipo 2 (Dupuis et al., 2010; Saxena et al., 2010). Además Wang et al generaron un modelo de ratón deficiente en ADYC3 que con dos meses de edad desarrolló obesidad (Wang et al., 2009). Estos indicios hacen pensar que la alteración de las adenilato ciclasas puede ser un factor importante en el desarrollo de la obesidad, como ocurre en otras patologías, en las que alteraciones en la expresión de proteínas G y adenilato ciclasas conllevan al desarrollo de hipertensión y diabetes (Li et al., 2008).

Otros genes relacionados con la regulación de la lipólisis y que mostraron una marcada inhibición en su expresión en ambos depósitos, SC y OM, fueron AZGP1 y CIDEA. El mecanismo de acción de CIDEA se basa en la unión a la superficie de la gota lipídica para inhibir la hidrólisis de los triglicéridos y así promover el almacenamiento lipídico (Puri et al., 2008). Acorde a nuestros resultados Nordström et al obtuvieron una disminución en el nivel de ARNm de pacientes obesos y mediante siARN silenciaron CIDEA en predipocitos humanos viendo un aumento de los niveles de lipólisis (Nordstrom et al., 2005).

AZGP1, fue descrita por primera vez como una proteína soluble, relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad (Burgi and Schmid, 1961). Sin embargo son muchas y heterógenas las funciones de esta proteína, desde progresión del cáncer de próstata, demencia, inhibición del ciclo celular o síntesis de melanina. Recientemente el estudio de esta glicoproteína se ha centrado en el papel que desempeña en relación a la obesidad estimulando la lipólisis. AZGP1 puede activar directamente la lipólisis, estimulando las adenilato ciclasas de la membrana del adipocito a través de la interacción con receptores beta 3 adrenérgicos (Bing et al., 2004). Curiosamente, al igual que las adenilato ciclasas, esta glicoproteína se encuentra inhibida en tejido adiposo OM y SC de obesos mórbidos.

Enzimas como enoil coenzima A (ECHDC) y acil-coenzima A oxidasa 2 (ACOX2) que inician los primeros pasos de la β -oxidación en los peroxisomas se encuentran reprimidas en tejido adiposo OM, contribuyendo al bloqueo lipídico que sufre el adipocito en condiciones de obesidad. Concretamente ACOX2 se encarga de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga ramificados. Se ha descrito que niveles insuficientes de esta enzima afectan a la producción de ácidos biliares. Estos ácidos son activadores del receptor farnesoide X (FXR) encargado de reducir los niveles de triglicéridos (Lefebvre et al., 2009). Por ello se ha establecido que ACOX2 puede regular los niveles de triglicéridos a través de FXR. Recientemente también se ha asociado

un SNP con la regulación transcripcional de ACOX2 con el nivel de triglicéridos en plasma (Johansson et al., 2011).

Otro gran regulador antilipolítico es el Neuropéptido Y. Sus receptores NPY1R y NPY5R, ambos involucrados en la regulación del peso corporal, se encuentran sobreexpresados en tejido adiposo OM, de acuerdo con estudios previos (Gomez-Ambrosi et al., 2004).

En este equilibrio de síntesis y degradación de triglicéridos, otra vía anabólica se ve afectada en nuestros resultados: la glucogénesis. El estudio de la glucogénesis se ha centrado sobre todo en el músculo e hígado pasando desapercibido en tejido adiposo. En la síntesis de glucógeno participan la glicógeno sintasa 1 (GYS1) y la glicógeno fosforilasa (PYGM) (Taylor et al., 2006). Ambas enzimas junto con el factor de transcripción "*Forkhead box O12 1A*" (FOXO1A), encargado de la activación de esta vía, muestran una bajada en su nivel de ARNm en tejido adiposo OM y SC en obesos mórbidos. La bajada de la expresión de estos genes en la glucogénesis puede ser explicada por la resistencia insulínica a nivel del adipocito. La resistencia insulínica es un estado caracterizado por disminución de la acción de la insulina, lo que implica una alteración de las acciones de la hormona en el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos.

Otra de las principales señales afectadas en obesidad es la relacionada con la leptina. En pacientes obesos la leptina se encuentra a altos niveles desarrollando una resistencia en la vía de señalización de la misma. La activación de la vía de leptina está mediada por los receptores y la vía de señalización JAK/STAT, la cual ve inhibida su actividad en condiciones de resistencia a la leptina (Cheng et al., 2002). STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) está regulado por la Proteína inhibidora de STAT activa 3 (PIAS3) (Chung et al., 1997). Aunque no se han encontrado estudios previos que relacionan PIAS3 con obesidad en tejido adiposo humano, nosotros encontramos una disminución en la expresión, siendo el único gen junto con la leptina y el receptor de leptina de esta vía que se encuentran alterados.

Se ha demostrado que la expansión del tejido adiposo es dependiente de la angiogénesis (Mehta et al., 2010). Un gen involucrado en la neovascularización cuya expresión está aumentada en nuestros resultados, es la tenomodulina (TNMD). La expresión de esta glicoproteína de membrana correlaciona con obesidad, alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y dislipidemia (Tolppanen et al., 2007; Tolppanen et al., 2008) además se ha publicado recientemente su aumento de expresión en tejido adiposo SC (Saiki et al., 2009). Todo esto hace pensar que la TNMD podría ser importante en el desarrollo de la obesidad.

Este estudio con microarrays de ADN nos ha permitido, además de ver las diferencias en las rutas metabólicas, encontrar una multitud de factores de transcripción que parecen ser importantes en el desarrollo de la obesidad. De todos estos factores, seleccionamos varios a validar como HOXA7 relacionado con el origen de la obesidad y la distribución de la grasa corporal (Gesta et al., 2006); FOXO1, relacionado con la resistencia insulínica y metabolismo del glucógeno como se ha mencionado anteriormente (Barthel et al., 2005); NCOA6, coactivador de múltiples receptores nucleares y factores de transcripción como PPARG y CEBPA (Lee et al., 2008); y ZBTB16 miembros de la familia Krüppel-like factor, con función represora. Entre los genes de esta familia, klf2 se ha descrito como un regulador negativo de la diferenciación del adipocito (Hackl et al., 2005) por lo que pueden tener cierta relación con la regulación del adipocito. Además el factor ZBTB16, podría ser un candidato importante en Síndrome Metabólico. En un estudio donde aislaron una región genómica de 1.4 Mb del cromosoma 8 de rata encontraron asociación de esta región con la presencia de polidactilia, mayor peso corporal, aumento del perfil lipídico y desarrollo de resistencia a insulina. Uno de los genes que se encuentran en esa zona es el ZBTB16 (Seda et al., 2005).

La aplicación de microarrays para el estudio de la obesidad representa una poderosa herramienta para la determinación de diferencias en el perfil de expresión de obesos mórbidos. Nuestros datos aportan nuevos genes que no habían sido descritos anteriormente en esta patología y que podrían estar implicados tanto en el desarrollo como en la predisposición a la obesidad, resaltando claras diferencias entre el tejido adiposo SC y el OM. En el futuro, la caracterización genética de la obesidad y la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en su patogenia, permitirán utilizar diferentes estrategias terapéuticas dirigidas a dianas concretas.

5. CONCLUSIONES

1. El gen IPO8 junto con la proteína nucleolar FBXL10 son buenos candidatos como genes referencia en estudios de expresión génica de muestras de tejido adiposo SC y OM, y de cultivos de preadipocitos humanos diferenciados. IPO8 fue el gen más estable y consistente en los tres métodos estadísticos utilizados (GeNorm, NormFinder y CV). FBXL10 fue el gen más estable obtenido en el estudio de los microarrays. Ambos mostraron unos coeficientes de variación muy bajos en cultivo de preadipocitos humanos diferenciados bajo seis tipos de tratamientos hormonales y a lo largo de la diferenciación.
2. La aplicación de microarrays y PCR a tiempo real en el estudio de la expresión génica en tejido adiposo SC y OM de pacientes obesos versus delgados, reveló grandes diferencias entre ambos depósitos, en cuanto al número de genes que vieron alterada su expresión génica, así como en los procesos biológicos en los que se agrupaban los genes afectados.
3. El estudio con microarrays reveló un gran número de genes que no han sido previamente asociados con la obesidad y cuya función es desconocida.
4. En el tejido adiposo OM 545 genes aumentaron su expresión de forma significativa y 47 genes en tejido adiposo SC. El número de genes en los que se encontró una inhibición de la expresión fue de 723 genes en tejido adiposo OM y 27 genes en tejido adiposo SC. Los genes alterados se agruparon principalmente en procesos de inmunidad y defensa, metabolismo proteico, transducción de señales y metabolismo de los ácidos nucleicos.
5. Atendiendo al metabolismo lipídico, en este estudio se encontró una disminución de la expresión de genes involucrados en las vías lipogénicas y lipolíticas, lo que sugiere un mecanismo de respuesta por parte del tejido adiposo a la excesiva expansión y acumulación de ácidos grasos.
6. Uno de los genes inhibidos fue ChREBP, regulador transcripcional de la lipogénesis. La expresión de este factor de transcripción disminuyó tanto en tejido adiposo OM como en SC de pacientes obesos mórbidos en comparación con sujetos delgados.
7. ChREBP mostró una regulación opuesta en hígado y tejido adiposo, junto con enzimas lipogénicas como FASN. Ambos mostraron una bajada del nivel de ARNm en tejido adiposo de obesos mórbidos, y un aumento del ARNm y proteína en hígado de obesos mórbidos.

8. El factor de transcripción ChREBP mostró un llamativo aumento de la expresión a distintos días de la diferenciación de preadipocitos humanos aislados de tejido adiposo OM y SC de obesos mórbidos. Además se vio fuertemente regulado por la presencia o ausencia de insulina.
9. La regulación opuesta encontrada en el factor de transcripción ChREBP y algunas de las enzimas que regula, en hígado y tejido adiposo, explicaría la limitada capacidad lipogénica del tejido adiposo y la consecuente lipotoxicidad producida en otros órganos como el hígado.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahima, R.S., Saper, C.B., Flier, J.S., and Elmquist, J.K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21, 263-307.
- Ahmadian, M., Duncan, R.E., and Sul, H.S. (2009). The skinny on fat: lipolysis and fatty acid utilization in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* 20, 424-428.
- Alexander, M.C., Lomanto, M., Nasrin, N., and Ramaika, C. (1988). Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5092-5096.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245-5250.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., *et al.* (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 79-83.
- Arner, P. (1999). Catecholamine-induced lipolysis in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1, 10-13.
- Averill, M.M., Barnhart, S., Becker, L., Li, X., Heinecke, J.W., Leboeuf, R.C., Hamerman, J.A., Sorg, C., Kerkhoff, C., and Bornfeldt, K.E. (2011a). S100A9 Differentially Modifies Phenotypic States of Neutrophils, Macrophages, and Dendritic Cells: Implications for Atherosclerosis and Adipose Tissue Inflammation. *Circulation*.
- Averill, M.M., Barnhart, S., Becker, L., Li, X., Heinecke, J.W., Leboeuf, R.C., Hamerman, J.A., Sorg, C., Kerkhoff, C., and Bornfeldt, K.E. (2011b). S100A9 Differentially Modifies Phenotypic States of Neutrophils, Macrophages, and Dendritic Cells: Implications for Atherosclerosis and Adipose Tissue Inflammation. *Circulation* 123, 1216-1226.
- Baranova, A., Collantes, R., Gowder, S.J., Elariny, H., Schlauch, K., Younoszai, A., King, S., Randhawa, M., Pusulury, S., Alsheddi, T., *et al.* (2005). Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. *Obes Surg* 15, 758-765.
- Barbe, P., Millet, L., Galitzky, J., Lafontan, M., and Berlan, M. (1996). In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol* 117, 907-913.
- Barroso, I., Benito, B., Garci-Jimenez, C., Hernandez, A., Obregon, M.J., and Santisteban, P. (1999). Norepinephrine, tri-iodothyronine and insulin upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA during Brown adipocyte differentiation. *Eur J Endocrinol* 141, 169-179.
- Barthel, A., Schmoll, D., and Unterman, T.G. (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 16, 183-189.
- Berndt, J., Kovacs, P., Ruschke, K., Kloting, N., Fasshauer, M., Schon, M.R., Korner, A., Stumvoll, M., and Bluher, M. (2007). Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 1472-1480.
- Bickerton, A.S., Roberts, R., Fielding, B.A., Tornqvist, H., Blaak, E.E., Wagenmakers, A.J., Gilbert, M., Humphreys, S.M., Karpe, F., and Frayn, K.N. (2008). Adipose tissue fatty acid metabolism in insulin-resistant men. *Diabetologia* 51, 1466-1474.

- Bing, C., Bao, Y., Jenkins, J., Sanders, P., Manieri, M., Cinti, S., Tisdale, M.J., and Trayhurn, P. (2004). Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2500-2505.
- Boizard, M., Le Liepvre, X., Lemarchand, P., Foufelle, F., Ferre, P., and Dugail, I. (1998). Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *J Biol Chem* 273, 29164-29171.
- Brandt, J.M., Djouadi, F., and Kelly, D.P. (1998). Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 273, 23786-23792.
- Brasaemle, D.L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48, 2547-2559.
- Brichard, S.M., Delporte, M.L., and Lambert, M. (2003). Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. *Horm Metab Res* 35, 337-342.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 50 Suppl, S15-27.
- Brownsey, R.W., Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa, J.E., and Lee, W.M. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 34, 223-227.
- Burgi, W., and Schmid, K. (1961). Preparation and properties of Zn-alpha 2-glycoprotein of normal human plasma. *J Biol Chem* 236, 1066-1074.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23-39.
- Butte, A.J., Dzau, V.J., and Glueck, S.B. (2001). Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues". *Physiol Genomics* 7, 95-96.
- Cancello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.L., *et al.* (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54, 2277-2286.
- Cartwright, M.J., Tchkonina, T., and Kirkland, J.L. (2007). Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp Gerontol* 42, 463-471.
- Catalan, V., Gomez-Ambrosi, J., Rotellar, F., Silva, C., Rodriguez, A., Salvador, J., Gil, M.J., Cienfuegos, J.A., and Fruhbeck, G. (2007). Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 39, 495-500.
- Cifuentes, M., Albala, C., and Rojas, C.V. (2008). Differences in lipogenesis and lipolysis in obese and non-obese adult human adipocytes. *Biol Res* 41, 197-204.
- Claycombe, K.J., Jones, B.H., Standridge, M.K., Guo, Y., Chun, J.T., Taylor, J.W., and Moustaid-Moussa, N. (1998). Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes. *Am J Physiol* 274, R1253-1259.

- Coe, N.R., Simpson, M.A., and Bernlohr, D.A. (1999). Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 40, 967-972.
- Chen, Y.X., Huang, A.L., and Ruan, X.Z. (2007). Nuclear transcription factors and lipid homeostasis in liver. *Chin Med J (Engl)* 120, 2290-2296.
- Cheng, A., Uetani, N., Simonicic, P.D., Chaubey, V.P., Lee-Loy, A., McGlade, C.J., Kennedy, B.P., and Tremblay, M.L. (2002). Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2, 497-503.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.
- Davies, M.N., O'Callaghan, B.L., and Towle, H.C. (2008). Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity. *J Biol Chem* 283, 24029-24038.
- de Jonge, H.J., Fehrmann, R.S., de Bont, E.S., Hofstra, R.M., Gerbens, F., Kamps, W.A., de Vries, E.G., van der Zee, A.G., te Meerman, G.J., and ter Elst, A. (2007). Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* 2, e898.
- Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Fougelle, F., Dyck, J.R., Girard, J., and Postic, C. (2006). Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55, 2159-2170.
- Dentin, R., Benhamed, F., Pegorier, J.P., Fougelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., and Postic, C. (2005a). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 115, 2843-2854.
- Dentin, R., Girard, J., and Postic, C. (2005b). Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87, 81-86.
- Dentin, R., Pegorier, J.P., Benhamed, F., Fougelle, F., Ferre, P., Fauveau, V., Magnuson, M.A., Girard, J., and Postic, C. (2004). Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 279, 20314-20326.
- Diraison, F., Dusserre, E., Vidal, H., Sothier, M., and Beylot, M. (2002). Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E46-51.
- Doiron, B., Cuif, M.H., Kahn, A., and Diaz-Guerra, M.J. (1994). Respective roles of glucose, fructose, and insulin in the regulation of the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. *J Biol Chem* 269, 10213-10216.
- Dugail, I., Quignard-Boulange, A., Bazin, R., Le Liepvre, X., and Lavau, M. (1988). Adipose-tissue-specific increase in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and mRNA amounts in suckling pre-obese Zucker rats. Effect of weaning. *Biochem J* 254, 483-487.
- Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A.U., Wheeler, E., Glazer, N.L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A.L., *et al.* (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 42, 105-116.

- Eguchi, J., Wang, X., Yu, S., Kershaw, E.E., Chiu, P.C., Dushay, J., Estall, J.L., Klein, U., Maratos-Flier, E., and Rosen, E.D. (2011). Transcriptional Control of Adipose Lipid Handling by IRF4. *Cell Metab* 13, 249-259.
- Elizondo, A., Araya, J., Rodrigo, R., Poniachik, J., Csendes, A., Maluenda, F., Diaz, J.C., Signorini, C., Sgherri, C., Comporti, M., *et al.* (2007). Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 15, 24-31.
- Ferre, P., and Foufelle, F. (2007). SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res* 68, 72-82.
- Ferre, P., and Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2, 83-92.
- Fox, C.S., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Pou, K.M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C.Y., Vasan, R.S., Murabito, J.M., Meigs, J.B., Cupples, L.A., *et al.* (2007). Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 116, 39-48.
- Fraze, E., Donner, C.C., Swislocki, A.L., Chiou, Y.A., Chen, Y.D., and Reaven, G.M. (1985). Ambient plasma free fatty acid concentrations in noninsulin-dependent diabetes mellitus: evidence for insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 61, 807-811.
- Fredrikson, G., Tornqvist, H., and Belfrage, P. (1986). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 876, 288-293.
- Frescas, D., Guardavaccaro, D., Bassermann, F., Koyama-Nasu, R., and Pagano, M. (2007). JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature* 450, 309-313.
- Fried, S.K., Bunkin, D.A., and Greenberg, A.S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 847-850.
- Friedman, J.M. (2000). Obesity in the new millennium. *Nature* 404, 632-634.
- Gabrielsson, B.G., Johansson, J.M., Jennische, E., Jernas, M., Itoh, Y., Peltonen, M., Olbers, T., Lonn, L., Lonroth, H., Sjostrom, L., *et al.* (2002). Depot-specific expression of fibroblast growth factors in human adipose tissue. *Obes Res* 10, 608-616.
- Gabrielsson, B.G., Johansson, J.M., Lonn, M., Jernas, M., Olbers, T., Peltonen, M., Larsson, I., Lonn, L., Sjostrom, L., Carlsson, B., *et al.* (2003). High expression of complement components in omental adipose tissue in obese men. *Obes Res* 11, 699-708.
- Gabrielsson, B.G., Olofsson, L.E., Sjogren, A., Jernas, M., Elander, A., Lonn, M., Rudemo, M., and Carlsson, L.M. (2005). Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obes Res* 13, 649-652.
- Gabrielsson, B.L., Carlsson, B., and Carlsson, L.M. (2000). Partial genome scale analysis of gene expression in human adipose tissue using DNA array. *Obes Res* 8, 374-384.
- Gastaldelli, A., Toschi, E., Pettiti, M., Frascerra, S., Quinones-Galvan, A., Sironi, A.M., Natali, A., and Ferrannini, E. (2001). Effect of physiological hyperinsulinemia on gluconeogenesis in nondiabetic subjects and in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50, 1807-1812.

- Gesta, S., Bluher, M., Yamamoto, Y., Norris, A.W., Berndt, J., Kralisch, S., Boucher, J., Lewis, C., and Kahn, C.R. (2006). Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6676-6681.
- Giorgino, F., Laviola, L., and Eriksson, J.W. (2005). Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand* 183, 13-30.
- Glazier, A.M., Nadeau, J.H., and Aitman, T.J. (2002). Finding genes that underlie complex traits. *Science* 298, 2345-2349.
- Gomez-Ambrosi, J., Catalan, V., Diez-Caballero, A., Martinez-Cruz, L.A., Gil, M.J., Garcia-Foncillas, J., Cienfuegos, J.A., Salvador, J., Mato, J.M., and Fruhbeck, G. (2004). Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *FASEB J* 18, 215-217.
- Goodpaster, B.H., Krishnaswami, S., Harris, T.B., Katsiaras, A., Kritchevsky, S.B., Simonsick, E.M., Nevitt, M., Holvoet, P., and Newman, A.B. (2005). Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Arch Intern Med* 165, 777-783.
- Gorzelnjak, K., Janke, J., Engeli, S., and Sharma, A.M. (2001). Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* 33, 625-627.
- Granneman, J.G., and Moore, H.P. (2008). Location, location: protein trafficking and lipolysis in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* 19, 3-9.
- Hackl, H., Burkard, T.R., Sturn, A., Rubio, R., Schleiffer, A., Tian, S., Quackenbush, J., Eisenhaber, F., and Trajanoski, Z. (2005). Molecular processes during fat cell development revealed by gene expression profiling and functional annotation. *Genome Biol* 6, R108.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T.M., Wagner, E.F., and Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277, 4806-4815.
- Hamaguchi, M., Kojima, T., Takeda, N., Nakagawa, T., Taniguchi, H., Fujii, K., Omatsu, T., Nakajima, T., Sarui, H., Shimazaki, M., *et al.* (2005). The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 143, 722-728.
- Hamilton, B.S., Paglia, D., Kwan, A.Y., and Deitel, M. (1995). Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1, 953-956.
- Harman-Boehm, I., Bluher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Kloting, N., Stumvoll, M., Bashan, N., *et al.* (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2240-2247.
- Harris, R.B., and Leibel, R.L. (2008). Location, location, location. *Cell Metab* 7, 359-361.
- Hauner, H. (2005). Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 64, 163-169.
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., and Pfeiffer, E.F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84, 1663-1670.
- He, Z., Jiang, T., Wang, Z., Levi, M., and Li, J. (2004). Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E424-430.

- Hoffstedt, J., Forster, D., and Lofgren, P. (2007). Impaired subcutaneous adipocyte lipogenesis is associated with systemic insulin resistance and increased apolipoprotein B/AI ratio in men and women. *J Intern Med* 262, 131-139.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95, 2409-2415.
- Hudgins, L.C., Baday, A., Hellerstein, M.K., Parker, T.S., Levine, D.M., Seidman, C.E., Neese, R.A., Tremaroli, J.D., and Hirsch, J. (2008). The effect of dietary carbohydrate on genes for fatty acid synthase and inflammatory cytokines in adipose tissues from lean and obese subjects. *J Nutr Biochem* 19, 237-245.
- Hurtado del Pozo, C., Calvo, R.M., Vesperinas-Garcia, G., Gomez-Ambrosi, J., Fruhbeck, G., Corripio-Sanchez, R., Rubio, M.A., and Obregon, M.J. (2010). IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 18, 897-903.
- Hurtado Del Pozo, C., Calvo, R.M., Vesperinas-Garcia, G., Gomez-Ambrosi, J., Fruhbeck, G., Rubio, M.A., and Obregon, M.J. (2011). Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes Surg* 21, 633-643.
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., and Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7281-7286.
- Iizuka, K., Miller, B., and Uyeda, K. (2006). Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E358-364.
- Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., and Gross, R.W. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279, 48968-48975.
- Jocken, J.W., Langin, D., Smit, E., Saris, W.H., Valle, C., Hul, G.B., Holm, C., Arner, P., and Blaak, E.E. (2007). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2292-2299.
- Johansson, A., Curran, J.E., Johnson, M.P., Freed, K.A., Fenstad, M.H., Bjorge, L., Eide, I.P., Carless, M.A., Rainwater, D.L., Goring, H.H., *et al.* (2011). Identification of ACOX2 as a shared genetic risk factor for preeclampsia and cardiovascular disease. *Eur J Hum Genet*.
- Johansson, F., Kramer, F., Barnhart, S., Kanter, J.E., Vaisar, T., Merrill, R.D., Geng, L., Oka, K., Chan, L., Chait, A., *et al.* (2008). Type 1 diabetes promotes disruption of advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2082-2087.
- Johansson, S., Fuchs, A., Okvist, A., Karimi, M., Harper, C., Garrick, T., Sheedy, D., Hurd, Y., Bakalkin, G., and Ekstrom, T.J. (2007). Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. *Brain Res* 1132, 20-28.
- Johnson, M.L., Redmer, D.A., and Reynolds, L.P. (1995). Quantification of lane-to-lane loading of poly(A) RNA using a biotinylated oligo(dT) probe and chemiluminescent detection. *Biotechniques* 19, 712-715.

- Jones, B.H., Standridge, M.K., and Moustaid, N. (1997). Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 138, 1512-1519.
- Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B.E., and Uyeda, K. (2003). Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5107-5112.
- Kathiresan, S., Melander, O., Anevski, D., Guiducci, C., Burt, N.P., Roos, C., Hirschhorn, J.N., Berglund, G., Hedblad, B., Groop, L., *et al.* (2008a). Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med* 358, 1240-1249.
- Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surty, A., Burt, N.P., Rieder, M.J., Cooper, G.M., Roos, C., Voight, B.F., Havulinna, A.S., *et al.* (2008b). Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 40, 189-197.
- Kato, K., Suzuki, F., and Ogasawara, N. (1988). Induction of S100 protein in 3T3-L1 cells during differentiation to adipocytes and its liberating by lipolytic hormones. *Eur J Biochem* 177, 461-466.
- Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2001). Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13710-13715.
- Ke, L.D., Chen, Z., and Yung, W.K. (2000). A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Mol Cell Probes* 14, 127-135.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-2556.
- Keys, A., Fidanza, F., Karvonen, M.J., Kimura, N., and Taylor, H.L. (1972). Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis* 25, 329-343.
- Khalifallah, Y., Fages, S., Laville, M., Langin, D., and Vidal, H. (2000). Regulation of uncoupling protein-2 and uncoupling protein-3 mRNA expression during lipid infusion in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes* 49, 25-31.
- Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (1998a). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101, 1-9.
- Kim, J.B., and Spiegelman, B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10, 1096-1107.
- Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998b). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4333-4337.
- Kim, Y., and Park, T. (2010). DNA microarrays to define and search for genes associated with obesity. *Biotechnol J* 5, 99-112.
- Kissebah, A.H., and Krakower, G.R. (1994). Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 74, 761-811.
- Klein, S., Allison, D.B., Heymsfield, S.B., Kelley, D.E., Leibel, R.L., Nonas, C., and Kahn, R. (2007). Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from shaping America's health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 30, 1647-1652.

- Klein, S., Fontana, L., Young, V.L., Coggan, A.R., Kilo, C., Patterson, B.W., and Mohammed, B.S. (2004). Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 350, 2549-2557.
- Kolehmainen, M., Vidal, H., Alhava, E., and Uusitupa, M.I. (2001). Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity. *Obes Res* 9, 706-712.
- Kooner, J.S., Chambers, J.C., Aguilar-Salinas, C.A., Hinds, D.A., Hyde, C.L., Warnes, G.R., Gomez Perez, F.J., Frazer, K.A., Elliott, P., Scott, J., *et al.* (2008). Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat Genet* 40, 149-151.
- Kouadjo, K.E., Nishida, Y., Cadrin-Girard, J.F., Yoshioka, M., and St-Amand, J. (2007). Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics* 8, 127.
- Kreier, F., Fliers, E., Voshol, P.J., Van Eden, C.G., Havekes, L.M., Kalsbeek, A., Van Heijningen, C.L., Sluiter, A.A., Mettenleiter, T.C., Romijn, J.A., *et al.* (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J Clin Invest* 110, 1243-1250.
- Kreier, F., Kap, Y.S., Mettenleiter, T.C., van Heijningen, C., van der Vliet, J., Kalsbeek, A., Sauerwein, H.P., Fliers, E., Romijn, J.A., and Buijs, R.M. (2006). Tracing from fat tissue, liver, and pancreas: a neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. *Endocrinology* 147, 1140-1147.
- Kreth, S., Heyn, J., Grau, S., Kretschmar, H.A., Egensperger, R., and Kreth, F.W. (2010). Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro Oncol* 12, 570-579.
- Kumar, M.V., Shimokawa, T., Nagy, T.R., and Lane, M.D. (2002). Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1921-1925.
- Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48, 275-297.
- Latasa, M.J., Moon, Y.S., Kim, K.H., and Sul, H.S. (2000). Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter in vivo: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10619-10624.
- Lean, M.E. (2000). Pathophysiology of obesity. *Proc Nutr Soc* 59, 331-336.
- Lee, J., Saha, P.K., Yang, Q.H., Lee, S., Park, J.Y., Suh, Y., Lee, S.K., Chan, L., Roeder, R.G., and Lee, J.W. (2008). Targeted inactivation of MLL3 histone H3-Lys-4 methyltransferase activity in the mouse reveals vital roles for MLL3 in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19229-19234.
- Lee, P.D., Sladek, R., Greenwood, C.M., and Hudson, T.J. (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res* 12, 292-297.
- Lefebvre, A.M., Laville, M., Vega, N., Riou, J.P., van Gaal, L., Auwerx, J., and Vidal, H. (1998). Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47, 98-103.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., and Staels, B. (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89, 147-191.
- Lefterova, M.I., and Lazar, M.A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 20, 107-114.

- Lenard, N.R., and Berthoud, H.R. (2008). Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring)* 16 Suppl 3, S11-22.
- Letexier, D., Peroni, O., Pinteaur, C., and Beylot, M. (2005). In vivo expression of carbohydrate responsive element binding protein in lean and obese rats. *Diabetes Metab* 31, 558-566.
- Letexier, D., Pinteaur, C., Large, V., Frering, V., and Beylot, M. (2003). Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res* 44, 2127-2134.
- Levine, J.A., Eberhardt, N.L., and Jensen, M.D. (1999). Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans. *Science* 283, 212-214.
- Li, J., Takaishi, K., Cook, W., McCorkle, S.K., and Unger, R.H. (2003). Insig-1 "brakes" lipogenesis in adipocytes and inhibits differentiation of preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9476-9481.
- Li, Y., Descorbeth, M., and Anand-Srivastava, M.B. (2008). Role of oxidative stress in high glucose-induced decreased expression of Gialpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2845-2854.
- Liang, G., Yang, J., Horton, J.D., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 277, 9520-9528.
- Liu, A., McLaughlin, T., Liu, T., Sherman, A., Yee, G., Abbasi, F., Lamendola, C., Morton, J., Cushman, S.W., Reaven, G.M., *et al.* (2009). Differential intra-abdominal adipose tissue profiling in obese, insulin-resistant women. *Obes Surg* 19, 1564-1573.
- Liu, Y.M., Lacorte, J.M., Viguerie, N., Poitou, C., Pelloux, V., Guy-Grand, B., Coussieu, C., Langin, D., Basdevant, A., and Clement, K. (2003). Adiponectin gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese women in response to short-term very low calorie diet and refeeding. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5881-5886.
- Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., and Kuhajda, F.P. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288, 2379-2381.
- Lonnqvist, F., Thome, A., Nilsell, K., Hoffstedt, J., and Arner, P. (1995). A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity. *J Clin Invest* 95, 1109-1116.
- Ma, L., Tsatsos, N.G., and Towle, H.C. (2005). Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J Biol Chem* 280, 12019-12027.
- McQuaid, S.E., Hodson, L., Neville, M.J., Dennis, A.L., Cheeseman, J., Humphreys, S.M., Ruge, T., Gilbert, M., Fielding, B.A., Frayn, K.N., *et al.* (2011). Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes* 60, 47-55.
- Mehta, R., Birerdinc, A., Hossain, N., Afendy, A., Chandhoke, V., Younossi, Z., and Baranova, A. (2010). Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Mol Biol* 11, 39.
- Melotte, V., Lentjes, M.H., van den Bosch, S.M., Hellebrekers, D.M., de Hoon, J.P., Wouters, K.A., Daenen, K.L., Partouns-Hendriks, I.E., Stessels, F., Louwagie, J., *et al.* (2009). N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 101, 916-927.

- Minehira, K., Vega, N., Vidal, H., Acheson, K., and Tappy, L. (2004). Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 1291-1298.
- Mittendorfer, B., Magkos, F., Fabbrini, E., Mohammed, B.S., and Klein, S. (2009). Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. *Obesity (Silver Spring)* 17, 1872-1877.
- Mobbs, C.V., and Makimura, H. (2002). Block the FAS, lose the fat. *Nat Med* 8, 335-336.
- Mortensen, O.H., Nielsen, A.R., Erikstrup, C., Plomgaard, P., Fischer, C.P., Krogh-Madsen, R., Lindegaard, B., Petersen, A.M., Taudorf, S., and Pedersen, B.K. (2009). Calprotectin--a novel marker of obesity. *PLoS One* 4, e7419.
- Nadler, S.T., and Attie, A.D. (2001). Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr* 131, 2078-2081.
- Nasrin, N., Ercolani, L., Denaro, M., Kong, X.F., Kang, I., and Alexander, M. (1990). An insulin response element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene binds a nuclear protein induced by insulin in cultured cells and by nutritional manipulations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5273-5277.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E444-452.
- Nguewa, P.A., Agorreta, J., Blanco, D., Lozano, M.D., Gomez-Roman, J., Sanchez, B.A., Valles, I., Pajares, M.J., Pio, R., Rodriguez, M.J., *et al.* (2008). Identification of importin 8 (IPO8) as the most accurate reference gene for the clinicopathological analysis of lung specimens. *BMC Mol Biol* 9, 103.
- Nielsen, S., Guo, Z., Johnson, C.M., Hensrud, D.D., and Jensen, M.D. (2004). Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 113, 1582-1588.
- Nishimoto, S., Tawara, J., Toyoda, H., Kitamura, K., and Komurasaki, T. (2003). A novel homocysteine-responsive gene, *smap8*, modulates mitogenesis in rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem* 270, 2521-2531.
- Nordlie, R.C., Foster, J.D., and Lange, A.J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr* 19, 379-406.
- Nordman, S., Abulaiti, A., Hilding, A., Langberg, E.C., Humphreys, K., Ostenson, C.G., Efendic, S., and Gu, H.F. (2008). Genetic variation of the adenylyl cyclase 3 (AC3) locus and its influence on type 2 diabetes and obesity susceptibility in Swedish men. *Int J Obes (Lond)* 32, 407-412.
- Nordstrom, E.A., Ryden, M., Backlund, E.C., Dahlman, I., Kaaman, M., Blomqvist, L., Cannon, B., Nedergaard, J., and Arner, P. (2005). A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. *Diabetes* 54, 1726-1734.
- O'Rourke, R.W., Metcalf, M.D., White, A.E., Madala, A., Winters, B.R., Maizlin, II, Jobe, B.A., Roberts, C.T., Jr., Slifka, M.K., and Marks, D.L. (2009). Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 33, 978-990.

- Ong, J.M., and Kern, P.A. (1989). Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84, 305-311.
- Opie, L.H., and Walfish, P.G. (1963). Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *N Engl J Med* 268, 757-760.
- Ortega, F.J., Mayas, D., Moreno-Navarrete, J.M., Catalan, V., Gomez-Ambrosi, J., Esteve, E., Rodriguez-Hermosa, J.I., Ruiz, B., Ricart, W., Peral, B., *et al.* (2010). The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 18, 13-20.
- Osawa, H., Onuma, H., Ochi, M., Murakami, A., Yamauchi, J., Takasuka, T., Tanabe, F., Shimizu, I., Kato, K., Nishida, W., *et al.* (2005). Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 596-602.
- Osborne, T.F. (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 275, 32379-32382.
- Pan, L.A., Chen, Y.C., Huang, H., Zhang, L., Liu, R., Li, X., Qiang, O., and Zeng, Z. (2009). G771C Polymorphism in the MLXIPL Gene Is Associated with a Risk of Coronary Artery Disease in the Chinese: A Case-Control Study. *Cardiology* 114, 174-178.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-515.
- Polgar, N., Jaromi, L., Csongei, V., Maasz, A., Sipeky, C., Safrany, E., Szabo, M., and Melegh, B. (2010). Triglyceride level modifying functional variants of GALT2 and MLXIPL in patients with ischaemic stroke. *Eur J Neurol* 17, 1033-1039.
- Pou, K.M., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Lieb, K., Vasan, R.S., O'Donnell, C.J., and Fox, C.S. (2009). Patterns of abdominal fat distribution: the Framingham Heart Study. *Diabetes Care* 32, 481-485.
- Poulain-Godefroy, O., Lecoq, C., Pattou, F., Fruhbeck, G., and Froguel, P. (2008). Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1-7.
- Prieur, X., Mok, C.Y., Velagapudi, V.R., Nunez, V., Fuentes, L., Montaner, D., Ishikawa, K., Camacho, A., Barbarroja, N., O'Rahilly, S., *et al.* (2011). Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and m2/m1 polarization in obese mice. *Diabetes* 60, 797-809.
- Puri, V., Ranjit, S., Konda, S., Nicoloso, S.M., Straubhaar, J., Chawla, A., Chouinard, M., Lin, C., Burkart, A., Corvera, S., *et al.* (2008). Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7833-7838.
- Raclot, T. (2003). Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 42, 257-288.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siebert, W., and Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 856-862.

- Reeds, D.N., Stuart, C.A., Perez, O., and Klein, S. (2006). Adipose tissue, hepatic, and skeletal muscle insulin sensitivity in extremely obese subjects with acanthosis nigricans. *Metabolism* 55, 1658-1663.
- Riordan, N.H., Ichim, T.E., Min, W.P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Alfaro, M., Rodriguez, J.P., Harman, R.J., Patel, A.N., *et al.* (2009). Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med* 7, 29.
- Roberts, R., Hodson, L., Dennis, A.L., Neville, M.J., Humphreys, S.M., Harnden, K.E., Micklem, K.J., and Frayn, K.N. (2009). Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* 52, 882-890.
- Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Witters, L.A., Perruchoud, B., Yaney, G., Corkey, B., Asfari, M., and Prentki, M. (1997). Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J Biol Chem* 272, 3091-3098.
- Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., and Friedman, J.M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135, 240-249.
- Rodriguez-Acebes, S., Palacios, N., Botella-Carretero, J.I., Olea, N., Crespo, L., Peromingo, R., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M.A., Vazquez, C., and Martinez-Botas, J. (2010). Gene expression profiling of subcutaneous adipose tissue in morbid obesity using a focused microarray: distinct expression of cell-cycle- and differentiation-related genes. *BMC Med Genomics* 3, 61.
- Rolland, V., Le Liepvre, X., Houbiguan, M.L., Lavau, M., and Dugail, I. (1995). C/EBP alpha expression in adipose tissue of genetically obese Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun* 207, 761-767.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 145-171.
- Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281, 31-35.
- Saiki, A., Olsson, M., Jernas, M., Gummesson, A., McTernan, P.G., Andersson, J., Jacobson, P., Sjöholm, K., Olsson, B., Yamamura, S., *et al.* (2009). Tenomodulin is highly expressed in adipose tissue, increased in obesity, and down-regulated during diet-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 3987-3994.
- Saxena, R., Hivert, M.F., Langenberg, C., Tanaka, T., Pankow, J.S., Vollenweider, P., Lyssenko, V., Bouatia-Naji, N., Dupuis, J., Jackson, A.U., *et al.* (2010). Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. *Nat Genet* 42, 142-148.
- Schmittgen, T.D., and Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46, 69-81.
- Seda, O., Liska, F., Sedova, L., Kazdova, L., Krenova, D., and Kren, V. (2005). A 14-gene region of rat chromosome 8 in SHR-derived polydactylous congenic substrain affects muscle-specific insulin resistance, dyslipidaemia and visceral adiposity. *Folia Biol (Praha)* 51, 53-61.
- Serazin-Leroy, V., Morot, M., de Mazancourt, P., and Giudicelli, Y. (2001). Differences in type II, IV, V and VI adenylyl cyclase isoform expression between rat preadipocytes and adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1550, 37-51.
- Shaw, J.E., Zimmet, P.Z., McCarty, D., and de Courten, M. (2000). Type 2 diabetes worldwide according to the new classification and criteria. *Diabetes Care* 23 Suppl 2, B5-10.

- Shea, J., French, C.R., Bishop, J., Martin, G., Roebathan, B., Pace, D., Fitzpatrick, D., and Sun, G. (2009). Changes in the transcriptome of abdominal subcutaneous adipose tissue in response to short-term overfeeding in lean and obese men. *Am J Clin Nutr* 89, 407-415.
- Shetty, S., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2009). Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends Pharmacol Sci* 30, 234-239.
- Shih, H.M., and Towle, H.C. (1992). Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Evidence for a common factor required for carbohydrate regulation of hepatic genes. *J Biol Chem* 267, 13222-13228.
- Shimano, H. (2002). Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism. *Vitam Horm* 65, 167-194.
- Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R.E., Herz, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Horton, J.D. (1997). Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* 100, 2115-2124.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., and Horton, J.D. (1999). Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274, 30028-30032.
- Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B.S., Bashmakov, Y., and Horton, J.D. (1998). Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 273, 35299-35306.
- Shoelson, S.E., Herrero, L., and Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180.
- Sims, E.A. (2001). Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism* 50, 1499-1504.
- Sims, E.A., and Danforth, E., Jr. (1987). Expenditure and storage of energy in man. *J Clin Invest* 79, 1019-1025.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., and Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1023-1033.
- Snijder, M.B., Dekker, J.M., Visser, M., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D., Kostense, P.J., Yudkin, J.S., Heine, R.J., Nijpels, G., and Seidell, J.C. (2003). Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr* 77, 1192-1197.
- Solanas, M., Moral, R., and Escrich, E. (2001). Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. *Anal Biochem* 288, 99-102.
- Sorby, L.A., Andersen, S.N., Bukholm, I.R., and Jacobsen, M.B. (2010). Evaluation of suitable reference genes for normalization of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 29, 144.
- Soukas, A., Cohen, P., Socci, N.D., and Friedman, J.M. (2000). Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 14, 963-980.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., *et al.* (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.

- Spanakis, E. (1993). Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* 21, 3809-3819.
- Sparks, L.M., Pasarica, M., Sereda, O., deJonge, L., Thomas, S., Loggins, H., Xie, H., Miles, J.M., and Smith, S.R. (2009). Effect of adipose tissue on the sexual dimorphism in metabolic flexibility. *Metabolism* 58, 1564-1571.
- Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543.
- Steppan, C.M., and Lazar, M.A. (2004). The current biology of resistin. *J Intern Med* 255, 439-447.
- Striz, I., and Trebichavsky, I. (2004). Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 53, 245-253.
- Surmi, B.K., and Hasty, A.H. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 3, 545-556.
- Suzuki, T., Higgins, P.J., and Crawford, D.R. (2000). Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29, 332-337.
- Swierczynski, J., Zabrocka, L., Goyke, E., Raczynska, S., Adamonis, W., and Sledzinski, Z. (2003). Enhanced glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity in adipose tissue of obese humans. *Mol Cell Biochem* 254, 55-59.
- Tang, Q.Q., Otto, T.C., and Lane, M.D. (2003). CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 850-855.
- Taylor, A.J., Ye, J.M., and Schmitz-Peiffer, C. (2006). Inhibition of glycogen synthesis by increased lipid availability is associated with subcellular redistribution of glycogen synthase. *J Endocrinol* 188, 11-23.
- Tchkonia, T., Tchoukalova, Y.D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R.A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., *et al.* (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E267-277.
- Thorne, A., Lonnqvist, F., Aelman, J., Hellers, G., and Arner, P. (2002). A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 193-199.
- Tolppanen, A.M., Pulkkinen, L., Kolehmainen, M., Schwab, U., Lindstrom, J., Tuomilehto, J., and Uusitupa, M. (2007). Tenomodulin is associated with obesity and diabetes risk: the Finnish diabetes prevention study. *Obesity (Silver Spring)* 15, 1082-1088.
- Tolppanen, A.M., Pulkkinen, L., Kuulasmaa, T., Kolehmainen, M., Schwab, U., Lindstrom, J., Tuomilehto, J., Uusitupa, M., and Kuusisto, J. (2008). The genetic variation in the tenomodulin gene is associated with serum total and LDL cholesterol in a body size-dependent manner. *Int J Obes (Lond)* 32, 1868-1872.
- Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A., and Spiegelman, B.M. (1993). ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 13, 4753-4759.
- Tran, T.T., and Kahn, C.R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol* 6, 195-213.

- Tran, T.T., Yamamoto, Y., Gesta, S., and Kahn, C.R. (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7, 410-420.
- Tseng, Y.H., Cypess, A.M., and Kahn, C.R. (2010). Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* 9, 465-482.
- Uyeda, K., and Repa, J.J. (2006). Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4, 107-110.
- van Harmelen, V., Dicker, A., Ryden, M., Hauner, H., Lonnqvist, F., Naslund, E., and Arner, P. (2002). Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. *Diabetes* 51, 2029-2036.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
- Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.H., and Sul, H.S. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279, 47066-47075.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1801, 338-349.
- Vohl, M.C., Sladek, R., Robitaille, J., Gurd, S., Marceau, P., Richard, D., Hudson, T.J., and Tchernof, A. (2004). A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 12, 1217-1222.
- Vrablik, M., Ceska, R., Adamkova, V., Peasey, A., Pikhart, H., Kubinova, R., Marmot, M., Bobak, M., and Hubacek, J.A. (2008). MLXIPL variant in individuals with low and high triglyceridemia in white population in Central Europe. *Hum Genet* 124, 553-555.
- Wajchenberg, B.L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21, 697-738.
- Wang, H., and Wollheim, C.B. (2002). ChREBP rather than USF2 regulates glucose stimulation of endogenous L-pyruvate kinase expression in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 277, 32746-32752.
- Wang, Y., Jones Voy, B., Urs, S., Kim, S., Soltani-Bejnood, M., Quigley, N., Heo, Y.R., Standridge, M., Andersen, B., Dhar, M., *et al.* (2004). The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. *J Nutr* 134, 1032-1038.
- Wang, Z., Li, V., Chan, G.C., Phan, T., Nudelman, A.S., Xia, Z., and Storm, D.R. (2009). Adult type 3 adenylyl cyclase-deficient mice are obese. *PLoS One* 4, e6979.
- Weickert, M.O., and Pfeiffer, A.F. (2006). Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 49, 1732-1741.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.
- Wong, R.H., and Sul, H.S. (2010). Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol* 10, 684-691.

- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., *et al.* (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* **112**, 1821-1830.
- Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., Ide, T., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., *et al.* (2002). Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice. *J Biol Chem* **277**, 19353-19357.
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., and Uyeda, K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9116-9121.
- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1993). SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**, 187-197.
- Zhang, Y., Bosse, Y., Marceau, P., Biron, S., Lebel, S., Richard, D., Vohl, M.C., and Tchernof, A. (2007). Gene expression variability in subcutaneous and omental adipose tissue of obese men. *Gene Expr* **14**, 35-46.
- Zhong, H., and Simons, J.W. (1999). Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 523-526.
- Zhu, G., Chang, Y., Zuo, J., Dong, X., Zhang, M., Hu, G., and Fang, F. (2001). Fudenine, a C-terminal truncated rat homologue of mouse prominin, is blood glucose-regulated and can up-regulate the expression of GAPDH. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 951-956.
- Zierath, J.R., Livingston, J.N., Thorne, A., Bolinder, J., Reynisdottir, S., Lonnqvist, F., and Arner, P. (1998). Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia* **41**, 1343-1354.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., *et al.* (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386.

ANEXO I

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados parcialmente en:

Artículos originales:

- **Hurtado del Pozo, C.**, Calvo, R.M., Vesperinas-Garcia, G., Gomez-Ambrosi, J., Frühbeck, G., Corripio-Sanchez, R., Rubio, M.A., and Obregon, M.J. (2010). IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 18, 897-903.
- **Hurtado Del Pozo, C.**, Calvo, R.M., Vesperinas-Garcia, G., Gomez-Ambrosi, J., Frühbeck, G., Rubio, M.A., and Obregon, M.J. (2011). Expression Profile in Omental and Subcutaneous Adipose Tissue from Lean and Obese Subjects. Repression of Lipolytic and Lipogenic Genes. *Obes Surg.* 21;633-643
- **Hurtado del Pozo, C.**, Vesperinas-Garcia, G., Rubio, M.A., Corripio-Sanchez, R., Torres-García, A.J., Obregon, M.J., Calvo, R.M. 2011. ChREBP expression in liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity. *Int J Obes (Lond)*. (En revision)

Otros trabajos realizados durante el desarrollo de la tesis:

Tinahones, F.J., Coín-aragüez, L., Mayas, M.D., García-Fuentes, E., Hurtado del Pozo, C., Vendrell, J., Cardona, F., Calvo, R.M., Obregon, M.J., El Bekay, R. Obesity-associated insulin resistance is potentially correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. 2011. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. (En revision)

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas:

INTERNACIONALES

AUTORES/AS: **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM Vesperinas G, Rubio MA, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Obregón MJ

TÍTULO: Changes in lipogenic and lipolytic pathways in subcutaneous and omental adipose tissue in morbid obesity

TIPO DE PARTICIPACIÓN: POSTER

CONGRESO: 27 Annual Meeting of the American Obesity Society

PUBLICACIÓN: *Obesity* 17 (Suppl 2), pp. S94, Poster 162-P

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Washington

AÑO: 2009

AUTORES/AS: **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM Vesperinas G, Garcia-Fuentes E, Mayas MD, Rubio MA, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Tinahones F, Obregón MJ

TÍTULO: Down regulation of Zinc alpha2 glycoprotein (AZGP1) in human obesity

TIPO DE PARTICIPACIÓN: POSTER

CONGRESO: 11th International Congress of Obesity (ICO2010)

PUBLICACIÓN: Pp114. T1 :PO.82

LUGAR DE CELEBRACIÓN: ESTOCOLMO

AÑO: 2010

NACIONALES

AUTORES/AS: **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM, Vesperinas G, Gomez-Ambrosi J, Frubeck G, Obregon MJ

TÍTULO: Genes controles para PCR cuantitativa Taqman en tejido adiposo humano

TIPO DE PARTICIPACIÓN: POSTER

CONGRESO: 50 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición

PUBLICACIÓN: "Endocrinología y Nutrición" Doyma, Barcelona, 2008. Volumen 55 (Monog 5), pp 77, Abstract 178

LUGAR DE CELEBRACIÓN: BILBAO

AÑO: 2008

AUTORES/AS: Martinez de Mena R, **Hurtado del Pozo C**, Obregon MJ

TÍTULO: Genes controles para PCR cuantitativa Taqman en adipocitos de rata en cultivo

TIPO DE PARTICIPACIÓN: POSTER

CONGRESO: 50 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición

PUBLICACIÓN: "Endocrinología y Nutrición" Doyma, Barcelona, 2008. Volumen 55 (Monog 5), pp 76, Abstract 176

LUGAR DE CELEBRACIÓN: BILBAO

AÑO: 2008

AUTORES/AS: . **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM Vesperinas G, Rubio MA, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Obregón MJ

TÍTULO: Alteracion en las vías lipogénicas y lipolíticas en tejido adiposo subcutaneo y omental de obesos morbidos

TIPO DE PARTICIPACIÓN: POSTER

CONGRESO: 51 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición

PUBLICACIÓN: ."Endocrinología y Nutrición" Doyma, Barcelona, 2009. Vol 56, especial congreso, pp 123, Abstract 239

LUGAR DE CELEBRACIÓN: ZARAGOZA

AÑO: 2009

AUTORES/AS: **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM Vesperinas G, Rubio MA, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Obregón MJ

TÍTULO: Alteracion en la expresion genica de obesos morbidos en homeostasis de la glucosa e insulina

TIPO DE PARTICIPACIÓN: POSTER

CONGRESO: IX Congreso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad, SEEDO

PUBLICACIÓN: Revista Española de Obesidad Vol 7 (5), pp. 280, Abstract 71, (2009)

LUGAR DE CELEBRACIÓN: A CORUÑA

AÑO: 2009

Symposiums Internacionales

AUTORES/AS: **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM, Martinez de Mena R, Vesperinas G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Obregón MJ

TÍTULO: Altered gene expression in morbid obesity

TIPO DE PARTICIPACIÓN: COMUNICACIÓN ORAL

CONGRESO: II Symposium del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutricion

PUBLICACIÓN: Libro de Abstracts, pag 39, C17, Nov 2008

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Isla de la Toja, A Coruña
AÑO: 2008

AUTORES/AS: **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM, Martinez de Mena R, Vesperinas G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Obregón MJ (Poster)

TÍTULO: Validation and evaluation of reference genes for quantitative gene expression analysis: Application on omental and subcutaneous human adipose tissues

TIPO DE PARTICIPACIÓN: POSTER

CONGRESO: III Simposium del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición

PUBLICACIÓN: Libro de Abstracts, pag 80, A16, Nov 2008.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Isla de la Toja, Coruña.

AUTORES/AS: Obregón MJ, **Hurtado del Pozo C**, Martinez de Mena R, Vesperinas G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Rubio MA, Calvo RM (Conferencia)

TÍTULO: Altered gene expression in morbid obesity

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Conferencia

CONGRESO: III Simposium del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición

PUBLICACIÓN: “Nuevas fronteras en Obesidad y Nutrición”, Libro de Abstracts, pag 25, L3, Nov 2009.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Isla de la Toja, Coruña.

AÑO: 2009

AUTORES/AS: **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM, Martinez de Mena, Vesperinas G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Rubio MA, Obregón MJ (Poster)

TÍTULO: IPO8 and FBLX10: New reference genes for gene expression studies in human adipose tissue

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster

CONGRESO: III Simposium del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición

PUBLICACIÓN: “Nuevas fronteras en Obesidad y Nutrición”, Libro de Abstracts, pag 53, FC5, Nov 2009.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Isla de la Toja, Coruña.

AÑO: 2009

AUTORES/AS: **Hurtado del Pozo C**, Calvo RM, Vesperinas G, Rubio MA, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Obregón MJ (Poster)

TÍTULO: Dysregulation of lipolytic pathways in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients

TIPO DE PARTICIPACIÓN: POSTER

CONGRESO: III Simposium del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición

PUBLICACIÓN: Libro de Abstracts, pag 52, FC4, Nov 2009.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Isla de la Toja, Coruña.

AÑO: 2009

ANEXO II

**GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TEJIDO ADIPOSO SC Y OM
EN PACIENTES OBESOS MÓRBIDOS**

OMENTAL

OM

UPREGULATED			
Gene ID	Fold change	Gene Name	Gene symbol
hCG15465	14,21	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100A9
hCG38538	12,15	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	SPP1
hCG1640978	8,74	tenomodulin	TNMD
hCG1770704	7,90	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A
hCG17003	7,30	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	IGJ
hCG1811178	6,31	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	PTPRC
hCG1981379	6,20	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	C1QA
hCG26513	6,15	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	GLIPR1
hCG1738998	6,13	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	PLA2G2A
hCG29510	6,06	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)	EBI2
hCG1777151	5,72	interferon, gamma-inducible protein 30	IFI30
hCG28329	5,72	unassigned	unassigned
hCG2038940	5,66	unassigned	unassigned
hCG2007854	5,19	Rho GTPase activating protein 18	ARHGAP18
hCG2037016	5,09	complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide	C1QG
hCG1811532	5,08	cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	CYBB
hCG27314	5,08	macrophage receptor with collagenous structure	MARCO
hCG1777068	4,98	C-type lectin domain family 10, member A	CLEC10A
hCG2039142	4,98	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for	gamma polypeptide
hCG39988	4,95	CD53 antigen	CD53
hCG20166	4,91	chromosome 1 open reading frame 38	C1orf38
hCG1739143	4,89	CD52 antigen (CAMPATH-1 antigen)	CD52
hCG1642415	4,89	G protein-coupled receptor 65	GPR65
hCG1820369	4,89	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	MYBL1
hCG1639985	4,79	chromosome 14 open reading frame 125	C14orf125
hCG2042707	4,64	unassigned	unassigned
hCG1775134	4,64	folate receptor 2 (fetal)	FOLR2
hCG25565	4,52	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	OAS1
hCG21217	4,44	transmembrane 4 L six family member 1	TM4SF1
hCG39967	4,43	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	C1QB
hCG43709	4,35	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	HLA-DRA
hCG24462	4,31	lysozyme (renal amyloidosis)	LYZ
hCG1998957	4,28	unassigned	unassigned
hCG2043376	4,24	unassigned	unassigned
hCG17831	4,11	V-set and immunoglobulin domain containing 4	VSIG4
hCG31495	4,03	osteoclast stimulating factor 1	OSTF1

hCG1742442	4,00	unassigned	unassigned
hCG33000	3,86	leptin (obesity homolog, mouse)	LEP
hCG41057	3,85	hypothetical LOC339123	LOC339123
hCG21979	3,81	hemoglobin, beta	HBB
hCG33335	3,79	triggering receptor expressed on myeloid cells 2	TREM2
hCG2029776	3,79	T-cell activation GTPase activating protein	TAGAP
hCG1774984	3,74	ecotropic viral integration site 2A	EVI2A
hCG29297	3,71	chemokine (C-C motif) ligand 13	CCL13
hCG21211	3,69	carboxypeptidase A3 (mast cell)	CPA3
hCG43680	3,68	allograft inflammatory factor 1	AIF1
hCG37353	3,67	prostaglandin D2 synthase, hematopoietic	PGDS
hCG1782423	3,65	unassigned	unassigned
hCG20013	3,61	vanin 1	VNN1
hCG31398	3,60	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	XRCC4
hCG39378	3,59	cathepsin S	CTSS
hCG32592	3,57	chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5
hCG1745306	3,52	unassigned	unassigned
hCG40728	3,50	neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	NCF2
hCG15321	3,47	chemokine (C-C motif) receptor 5	CCR5
hCG29961	3,47	acid phosphatase 5, tartrate resistant	ACP5
hCG1646475	3,44	serum amyloid A3 pseudogene	SAA3P
hCG20905	3,42	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13A1
hCG22220	3,42	mortality factor 4	MORF4
hCG2001518	3,39	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3	HLA-DRB3
hCG28303	3,35	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	ALOX5AP
hCG2041292	3,30	unassigned	unassigned
hCG18437	3,29	unassigned	unassigned
hCG1640300	3,27	folate receptor 3 (gamma)	FOLR3
hCG2020552	3,27	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	LCP1
hCG1784522	3,26	CD1D antigen, d polypeptide	CD1D
hCG28804	3,23	ecotropic viral integration site 2B	EVI2B
hCG2015868	3,22	histamine N-methyltransferase	HNMT
hCG40628	3,21	unassigned	unassigned
hCG23571	3,20	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	TYROBP
hCG1642807	3,19	unassigned	unassigned
hCG21764	3,13	unassigned	unassigned
hCG38141	3,11	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	KLRB1
hCG40033	3,10	heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1
hCG1745093	3,06	carboxypeptidase, vitellogenic-like	CPVL
hCG401131	3,06	unassigned	unassigned
hCG2039449	3,06	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	MS4A7
hCG39305	3,06	interleukin 10 receptor, alpha	IL10RA

hCG20067	3,06	aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase)	AKR1C4
hCG1643902	3,05	unassigned	unassigned
hCG20915	3,03	G protein-coupled receptor 171	GPR171
hCG2027212	3,03	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	MS4A6A
hCG1782057	3,00	placenta-specific 8	PLAC8
hCG1811541	2,97	unassigned	unassigned
hCG41112	2,97	hemopoietic cell kinase	HCK
hCG1640935	2,95	unassigned	unassigned
hCG2039600	2,95	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1	MARCH1
hCG2011223	2,94	interleukin 2 receptor, beta	IL2RB
hCG19196	2,94	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2
hCG20655	2,93	unassigned	unassigned
hCG2010232	2,93	unassigned	unassigned
hCG19711	2,92	unassigned	unassigned
hCG17233	2,91	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2	STEAP2
hCG1791972	2,89	unassigned	unassigned
hCG15079	2,86	lysosomal associated multispinning membrane protein 5	LAPTM5
hCG41034	2,83	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	UCHL1
hCG1995986	2,83	serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2	SPINT2
hCG2017792	2,82	unassigned	unassigned
hCG23770	2,81	FLJ45422 protein	FLJ45422
hCG2016494	2,81	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6E	MS4A6E
hCG1646360	2,80	potassium channel tetramerisation domain containing 12	KCTD12
hCG2043128	2,79	C-type lectin domain family 2, member B	CLEC2B
hCG1644130	2,75	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	HLA-DPA1
hCG20393	2,75	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	HSD17B6
hCG24798	2,74	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	SLC40A1
hCG2040276	2,72	N-myristoyltransferase 2	NMT2
hCG1812065	2,69	glycosyltransferase 28 domain containing 1	GLT28D1
hCG37687	2,68	formin-like 1	FMNL1
hCG1760566	2,67	chromosome 1 open reading frame 162	C1orf162
hCG1723965	2,67	cytochrome b-245, alpha polypeptide	CYBA
hCG1993871	2,67	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	CES1
hCG17046	2,66	interferon regulatory factor 8	IRF8
hCG91933	2,65	unassigned	unassigned
hCG19120	2,64	histone 1, H2ac	HIST1H2AC
hCG1980739	2,64	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	CD74
hCG40419	2,62	suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma, matriptase, epithin)	ST14
hCG1779046	2,61	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	UHMK1

hCG27376	2,60	RAB22A, member RAS oncogene family	RAB22A
hCG36838	2,60	glutaredoxin (thioltransferase)	GLRX
hCG36839	2,59	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)	MEF2C
hCG22476	2,59	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1
hCG21206	2,58	pleckstrin	PLEK
hCG1780859	2,58	chromatin modifying protein 1B	CHMP1B
hCG38394	2,58	unassigned	unassigned
hCG37832	2,56	hypothetical protein FLJ11127	FLJ11127
hCG38454	2,55	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	NRAS
hCG38554	2,54	UDP-glucose dehydrogenase	UGDH
hCG40406	2,54	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	MS4A4A
hCG2044801	2,52	indolethylamine N-methyltransferase	INMT
hCG32705	2,52	arrestin, beta 2	ARRB2
hCG1779987	2,50	cystatin A (stefin A)	CSTA
hCG39382	2,49	CK2 interacting protein 1	HQ0024c protein
hCG1646296	2,48	C-type lectin domain family 4, member A	CLEC4A
hCG1986718	2,47	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5	RASSF5
hCG39945	2,47	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	CXCL16
hCG23745	2,47	stathmin 1/oncoprotein 18	STMN1
hCG15018	2,46	unassigned	unassigned
hCG1779231	2,46	chromosome 6 open reading frame 129	C6orf129
hCG14851	2,46	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	HLA-DOA
hCG1820631	2,46	chromosome 6 open reading frame 192	C6orf192
hCG1811995	2,45	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	RAC2
hCG22354	2,45	jun dimerization protein 2	JDP2
hCG1743060	2,44	histone 1, H2al	HIST1H2AL
hCG20251	2,44	arylacetamide deacetylase-like 1	AADACL1
hCG24650	2,44	B-cell linker	BLNK
hCG1640983	2,43	histone 1, H2bh	HIST1H2BH
hCG1997574	2,42	unassigned	unassigned
hCG14965	2,41	unassigned	unassigned
hCG30338	2,41	PRO0149 protein	PRO0149
hCG1748307	2,40	signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1	SIT1
hCG38190	2,39	integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95), lymphocyte function-associated antigen 1	ITGB2
hCG15615	2,39	interleukin 32	IL32
hCG19573	2,39	platelet-activating factor receptor	PTAFR
hCG19132	2,37	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14	NUDT14
hCG32707	2,36	hypothetical protein FLJ14525	FLJ14525
hCG1810981	2,36	COMM domain containing 8	COMMD8
hCG201166	2,35	procollagen (type III) N-endopeptidase	PCOLN3
hCG1982256	2,35	unassigned	unassigned

hCG19276	2,34	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide 1	P4HA1
hCG32359	2,34	transmembrane protein 23	TMEM23
hCG39113	2,33	fibrinogen-like 2	FGL2
hCG23590	2,33	hematopoietic cell signal transducer	HCST
hCG1773987	2,33	transmembrane protein 19	TMEM19
hCG1997142	2,32	unassigned	unassigned
hCG23968	2,32	LAG1 longevity assurance homolog 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	LASS4
hCG1995701	2,29	unassigned	unassigned
hCG1640465	2,29	apoptotic peptidase activating factor	APAF1
hCG21935	2,28	NCK-associated protein 1-like	NCKAP1L
hCG37211	2,28	unassigned	unassigned
hCG1792223	2,27	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C	APOBEC3C
hCG28100	2,26	mannose receptor, C type 1	MRC1
hCG1640960	2,26	unassigned	unassigned
hCG21306	2,26	sorting nexin 16	SNX16
hCG1640891	2,26	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	RNASE1
hCG2017627	2,25	unassigned	unassigned
hCG20847	2,25	CD244 natural killer cell receptor 2B4	CD244
hCG39397	2,24	dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminophosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)	DPAGT1
hCG16475	2,24	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	GNB4
hCG1998059	2,23	unassigned	unassigned
hCG25456	2,23	transmembrane 7 superfamily member 1 (upregulated in kidney)	TM7SF1
hCG2036843	2,23	unassigned	unassigned
hCG33216	2,23	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	TAX1BP3
hCG2011413	2,21	calbindin 2, 29kDa (calretinin)	CALB2
hCG15786	2,21	G protein-coupled receptor 34	GPR34
hCG36823	2,21	arrestin domain containing 3	ARRDC3
hCG37180	2,21	phospholipid transfer protein	PLTP
hCG17305	2,20	annexin A1	ANXA1
hCG32729	2,19	SIL1 homolog, endoplasmic reticulum chaperone (<i>S. cerevisiae</i>)	SIL1
hCG1742011	2,18	unassigned	unassigned
hCG32814	2,18	periostin, osteoblast specific factor	POSTN
hCG29719	2,18	chromosome 9 open reading frame 77	C9orf77
hCG29141	2,17	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1
hCG21146	2,17	PYD and CARD domain containing	PYCARD
hCG1784033	2,17	cytochrome b5 reductase 4	CYB5R4
hCG37485	2,17	IQ motif containing GTPase activating protein 2	IQGAP2
hCG21254	2,17	legumain	LGMN
hCG17156	2,16	family with sequence similarity 79, member B	FAM79B

hCG2040346	2,16	unassigned	unassigned
hCG15852	2,16	unassigned	unassigned
hCG15721	2,15	activating transcription factor 2	ATF2
hCG1770706	2,15	protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	PPP4C
hCG37243	2,15	selenoprotein P, plasma, 1	SEPP1
hCG38304	2,14	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	RASGRP1
hCG1818634	2,13	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	IL2RG
hCG2000493	2,12	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	AP1S2
hCG30297	2,12	granulin	GRN
hCG1735849	2,12	unassigned	unassigned
hCG1640761	2,11	CGI-116 protein	CGI-116
hCG1734267	2,11	unassigned	unassigned
hCG22939	2,11	sialic acid binding Ig-like lectin 9	SIGLEC9
hCG1744184	2,11	unassigned	unassigned
hCG40424	2,11	synaptosomal-associated protein, 23kDa	SNAP23
hCG2042538	2,11	chondroitin sulfate synthase 3	CSS3
hCG38612	2,10	colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog	CSF1R
hCG1641060	2,10	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	SRXN1
hCG31755	2,09	galactosidase, beta 1	GLB1
hCG1810932	2,08	cisplatin resistance related protein CRR9p	CRR9
hCG1773750	2,08	caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE	COP1
hCG1820362	2,08	unassigned	unassigned
hCG25186	2,08	mitochondrial carrier homolog 2 (C. elegans)	MTCH2
hCG1773692	2,07	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	RARRES3
hCG1643352	2,07	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	IFIT2
hCG2042252	2,06	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7	SLC39A7
hCG40039	2,06	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 4	PSCD4
hCG2005178	2,06	amino-terminal enhancer of split	AES
hCG1648333	2,06	fatty acid desaturase 3	FADS3
hCG18161	2,05	tubby like protein 4	TULP4
hCG41455	2,05	apolipoprotein L, 1	APOL1
hCG2010436	2,04	H2B histone family, member S	H2BFS
hCG1995701	2,04	unassigned	unassigned
hCG16920	2,04	annexin A5	ANXA5
hCG38854	2,03	THO complex 4	THOC4
hCG1736510	2,03	sulfatase modifying factor 2	SUMF2
hCG1649993	2,03	unassigned	unassigned
hCG1801195	2,03	unassigned	unassigned
hCG27402	2,03	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	SLCO2B1
hCG14906	2,03	stannin	SNN

hCG2042976	2,02	dermokine	ZD52F10
hCG26981	2,02	ADP-ribosylation factor interacting protein 1 (arfaptin 1)	ARFIP1
hCG21056	2,02	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	PPP1CA
hCG39362	2,01	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1
hCG21870	2,01	tweety homolog 3 (Drosophila)	TTYH3
hCG1784573	2,00	sushi domain containing 3	SUSD3
hCG40855	2,00	cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)	CDC73
hCG41494	2,00	B-cell CLL/lymphoma 7B	BCL7B
hCG40762	1,99	C1GALT1-specific chaperone 1	C1GALT1C1
hCG39412	1,99	lysosomal-associated membrane protein 2	LAMP2
hCG2039593	1,99	family with sequence similarity 96, member A	FAM96A
hCG17915	1,99	family with sequence similarity 49, member B	FAM49B
hCG2043389	1,98	unassigned	unassigned
hCG37051	1,98	mitogen-activated protein kinase 6	MAPK6
hCG2041501	1,97	unassigned	unassigned
hCG1740228	1,97	angiotensin II receptor-associated protein	AGTRAP
hCG39927	1,97	chromosome 1 open reading frame 59	C1orf59
hCG1816239	1,96	unassigned	unassigned
hCG27160	1,96	major histocompatibility complex, class II, DM beta	HLA-DMB
hCG42012	1,95	mannose-P-dolichol utilization defect 1	MPDU1
hCG1818243	1,95	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	STAT1
hCG40040	1,95	tubulin alpha 6	TUBA6
hCG1816281	1,95	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	DHRS9
hCG24394	1,95	N-acetylneuraminate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)	NPL
hCG38522	1,95	PTX1 protein	PTX1
hCG1818367	1,95	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	DAB2
hCG1995168	1,94	similar to RIKEN cDNA 1500009M05 gene	LOC493856
hCG2023415	1,94	unassigned	unassigned
hCG1776267	1,94	RAB5A, member RAS oncogene family	RAB5A
hCG1812154	1,94	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7	SLC7A7
hCG2039945	1,93	unassigned	unassigned
hCG23263	1,92	synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	SNCG
hCG20783	1,92	chloride intracellular channel 1	CLIC1
hCG1765592	1,92	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	LY6E
hCG1640307	1,91	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	MAF
hCG31582	1,91	unassigned	unassigned
hCG21243	1,91	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	ITGAV
hCG31790	1,90	chromosome 20 open reading frame 24	C20orf24
hCG38144	1,90	RNA-binding protein	FLJ20273

hCG37455	1,90	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1	SLC16A1
hCG1641237	1,90	similar to hepatocellular carcinoma-associated antigen HCA557b	LOC151194
hCG1989840	1,90	unassigned	unassigned
hCG37884	1,90	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	CAPZA2
hCG31735	1,89	family with sequence similarity 49, member A	FAM49A
hCG1777783	1,89	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	SNCA
hCG1644144	1,88	unassigned	unassigned
hCG20913	1,88	selenoprotein T	SELT
hCG2043428	1,88	solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3	SLC35A3
hCG2011751	1,88	phosphoglycerate dehydrogenase like 1	PHGDHL1
hCG1998947	1,88	ubiquitin B	UBB
hCG1642371	1,88	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNFRSF1A
hCG41767	1,87	adhesion regulating molecule 1	ADRM1
hCG2020211	1,87	unassigned	unassigned
hCG36995	1,87	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	GNPDA1
hCG21121	1,87	hypothetical protein FLJ22688	FLJ22688
hCG26669	1,87	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	ACTR3
hCG16426	1,86	tec protein tyrosine kinase	TEC
hCG28845	1,86	chemokine-like factor superfamily 3	CKLFSF3
hCG14693	1,86	ring finger and WD repeat domain 2	RFWD2
hCG1640751	1,85	chromosome 6 open reading frame 115	C6orf115
hCG2041197	1,85	unassigned	unassigned
hCG15576	1,85	GDP-mannose pyrophosphorylase A	GMPPA
hCG23840	1,84	scavenger receptor class B, member 2	SCARB2
hCG1780455	1,84	RAB7, member RAS oncogene family	RAB7
hCG2040295	1,84	unassigned	unassigned
hCG41077	1,84	YTH domain family, member 3	YTHDF3
hCG1782986	1,83	unassigned	unassigned
hCG1993582	1,83	golgi SNAP receptor complex member 2	GOSR2
hCG1641505	1,83	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	SERPINB1
hCG36863	1,83	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM4
hCG15255	1,82	epithelial membrane protein 3	EMP3
hCG22687	1,82	unassigned	unassigned
hCG39730	1,81	transgelin 2	TAGLN2
hCG24047	1,81	chloride intracellular channel 4	CLIC4
hCG15462	1,81	unassigned	unassigned
hCG1995540	1,81	unassigned	unassigned
hCG1998376	1,80	endosulfine alpha	ENSA
hCG40405	1,80	eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E
hCG28546	1,80	cathepsin Z	CTSZ
hCG25946	1,80	scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M160	M160

hCG1773863	1,80	unassigned	unassigned
hCG23535	1,80	unassigned	unassigned
hCG2017591	1,80	tropomyosin 3	TPM3
hCG1814770	1,79	unassigned	unassigned
hCG1789360	1,79	unassigned	unassigned
hCG1787850	1,79	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa	ARPC3
hCG15695	1,79	coronin, actin binding protein, 1C	CORO1C
hCG1791876	1,79	unassigned	unassigned
hCG2031840	1,78	interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa	ILF2
hCG40608	1,78	regulator of G-protein signalling 10	RGS10
hCG2040285	1,78	unassigned	unassigned
hCG1811700	1,78	cylindromatosis (turban tumor syndrome)	CYLD
hCG30287	1,78	dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-related)	DUSP3
hCG22690	1,77	LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM7
hCG401151	1,77	GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa	GABPA
hCG29571	1,77	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)	UCHL3
hCG20036	1,77	implantation-associated protein	DKFZp564K142
hCG28185	1,77	dual specificity phosphatase 14	DUSP14
hCG2013819	1,77	S100 calcium binding protein A11 pseudogene	S100A11P
hCG2040170	1,77	unassigned	unassigned
hCG40096	1,77	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	GPD2
hCG1995506	1,77	phospholipase D family, member 3	PLD3
hCG33353	1,77	unassigned	unassigned
hCG1640591	1,77	unassigned	unassigned
hCG41008	1,77	N-acetylglucosamine kinase	NAGK
hCG25794	1,76	interleukin 10 receptor, beta	IL10RB
hCG2042798	1,76	transmembrane protein 49	TMEM49
hCG41721	1,76	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	ATF4
hCG2026171	1,76	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, 19kDa, alpha isoform (calcineurin B, type I)	PPP3R1
hCG37564	1,76	pyroglutamyl-peptidase I	PGPEP1
hCG1640850	1,76	unassigned	unassigned
hCG42856	1,76	ADAM metallopeptidase domain 10	ADAM10
hCG15253	1,76	zinc metallopeptidase (STE24 homolog, yeast)	ZMPSTE24
hCG1811175	1,76	sprouty-related, EVH1 domain containing 1	SPRED1
hCG15300	1,76	protein disulfide isomerase family A, member 4	PDIA4
hCG1817599	1,75	actin related protein 2/3 complex, subunit 5, 16kDa	ARPC5
hCG2013418	1,75	tubulin, alpha 1 (testis specific)	TUBA1
hCG16097	1,75	sterol-C4-methyl oxidase-like	SC4MOL
hCG33381	1,75	serine carboxypeptidase 1	SCPEP1
hCG32745	1,75	ubiquitin-fold modifier 1	UFM1
hCG29219	1,75	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	NEK6

hCG19421	1,74	biliverdin reductase A	BLVRA
hCG31729	1,74	CD68 antigen	CD68
hCG2025041	1,73	unassigned	unassigned
hCG41671	1,73	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	SNRPB
hCG1647676	1,73	kelch-like 9 (Drosophila)	KLHL9
hCG39408	1,73	nucleobindin 1	NUCB1
hCG39344	1,73	elongation factor 1 homolog (ELF1, S. cerevisiae)	ELOF1
hCG20864	1,73	translocation associated membrane protein 2	TRAM2
hCG1810779	1,73	unassigned	unassigned
hCG1811542	1,73	CD14 antigen	CD14
hCG41089	1,73	phosphatidylinositol transfer protein, beta	PITPNB
hCG32557	1,72	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1
hCG401305	1,72	chromosome 7 open reading frame 9	C7orf9
hCG1640203	1,72	unassigned	unassigned
hCG21965	1,72	splicing factor, arginine/serine-rich 5	SFRS5
hCG17175	1,72	mitogen-activated protein-binding protein-interacting protein	MAPBPIP
hCG15033	1,72	arginine-rich, mutated in early stage tumors	ARMET
hCG21712	1,72	Niemann-Pick disease, type C2	NPC2
hCG1647874	1,72	unassigned	unassigned
hCG1782433	1,71	unassigned	unassigned
hCG1745200	1,71	drebrin-like	DBNL
hCG31942	1,71	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	GCLM
hCG19152	1,71	chromosome 10 open reading frame 125	C10orf125
hCG15463	1,71	leptin receptor overlapping transcript-like 1	LEPROTL1
hCG40385	1,71	chemokine-like factor superfamily 6	CKLFSF6
hCG17642	1,71	trinucleotide repeat containing 5	TNRC5
hCG15522	1,71	unassigned	unassigned
hCG43349	1,71	fibrillarin	FBL
hCG19609	1,70	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	SMPDL3A
hCG20420	1,70	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	UBE2J2
hCG1736748	1,70	degenerative spermatocyte homolog 1, lipid desaturase (Drosophila)	DEGS1
hCG41542	1,70	unassigned	unassigned
hCG38783	1,70	nucleolar protein family A, member 3 (H/ACA small nucleolar RNPs)	NOLA3
hCG2043542	1,70	unassigned	unassigned
hCG16031	1,69	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	ZFP36L2
hCG18787	1,69	unassigned	unassigned
hCG1996391	1,69	ADAM metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	ADAM9
hCG401143	1,69	unassigned	unassigned
hCG25051	1,69	golgi transport 1 homolog B (S. cerevisiae)	GOLT1B
hCG20857	1,69	F11 receptor	F11R
hCG2032551	1,69	unassigned	unassigned

hCG16408	1,69	retinoblastoma binding protein 5	RBBP5
hCG2023395	1,69	unassigned	unassigned
hCG1643545	1,69	ADP-ribosylation factor 1 pseudogene	LOC442334
hCG1811473	1,68	complement component 3a receptor 1	C3AR1
hCG33087	1,68	unassigned	unassigned
hCG18116	1,68	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	MPP1
hCG19416	1,68	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 2	BLOC1S2
hCG1795423	1,68	unassigned	unassigned
hCG2039457	1,68	cofilin 1 (non-muscle)	CFL1
hCG39405	1,68	BCL2-antagonist of cell death	BAD
hCG16512	1,67	hypothetical protein MGC17943	MGC17943
hCG1775189	1,67	unassigned	unassigned
hCG37744	1,67	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	LHFPL2
hCG40338	1,67	N-myc (and STAT) interactor	NMI
hCG1646871	1,67	unassigned	unassigned
hCG27461	1,67	solute carrier family 25 (mitochondrial deoxynucleotide carrier), member 19	SLC25A19
hCG25108	1,67	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1	ALDH4A1
hCG29982	1,67	unassigned	unassigned
hCG39335	1,67	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1	OTUB1
hCG2012960	1,67	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	LRRFIP1
hCG37666	1,66	hypothetical protein BC011840	LOC93343
hCG2025089	1,66	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	RGL1
hCG2041363	1,66	unassigned	unassigned
hCG1644034	1,66	unassigned	unassigned
hCG20218	1,66	dehydrololichyl diphosphate synthase	DHDDS
hCG32856	1,66	MAWD binding protein	MAWBP
hCG1816984	1,66	unassigned	unassigned
hCG38950	1,66	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	UBE2N
hCG2042239	1,66	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	PDCD4
hCG43689	1,66	leukocyte specific transcript 1	LST1
hCG2031635	1,66	basic transcription factor 3-like 4	BTF3L4
hCG2018833	1,65	unassigned	unassigned
hCG18392	1,65	plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR
hCG1818087	1,65	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) pseudogene	TMED10P
hCG1739246	1,65	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	FUCA1
hCG40441	1,65	bridging integrator 1	BIN1
hCG1996837	1,64	unassigned	unassigned
hCG1746232	1,64	N-terminal asparagine amidase	NTAN1
hCG1758791	1,64	FCH domain only 2	FCHO2
hCG20240	1,64	unassigned	unassigned
hCG26457	1,64	unassigned	unassigned

hCG1644183	1,64	unassigned	unassigned
hCG36928	1,64	RAB8A, member RAS oncogene family	RAB8A
hCG37538	1,64	kinesin family member 5B	KIF5B
hCG25185	1,63	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3	PSMC3
hCG2042960	1,63	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)	GALNT1
hCG24318	1,63	cerebral cavernous malformation 2	CCM2
hCG2041284	1,63	unassigned	unassigned
hCG37404	1,63	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	PSMB3
hCG2005611	1,63	unassigned	unassigned
hCG41209	1,63	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	HNRPC
hCG20041	1,63	WD repeat domain 57 (U5 snRNP specific)	WDR57
hCG25108	1,63	solute carrier family 25, member 37	SLC25A37
hCG17186	1,62	chromosome 1 open reading frame 85	C1orf85
hCG32835	1,62	radixin	RDX
hCG1742332	1,62	chromosome 9 open reading frame 46	C9orf46
hCG1642736	1,62	unassigned	unassigned
hCG21224	1,62	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	ACTR2
hCG33381	1,62	hypothetical protein HSPC196	HSPC196
hCG25928	1,62	myeloid leukemia factor 2	MLF2
hCG22216	1,62	MYC associated factor X	MAX
hCG1770631	1,61	hypothetical protein MGC40499	MGC40499
hCG22424	1,61	CD3D antigen, delta polypeptide (TtT3 complex)	CD3D
hCG17341	1,61	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	PSME4
hCG2025762	1,61	BH3-only member B protein	BOMB
hCG2012498	1,61	S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	S100A10
hCG16687	1,61	zinc finger protein 226	ZNF226
hCG2039421	1,61	unassigned	unassigned
hCG1776965	1,61	phosphatidylinositol transfer protein, alpha	PITPNA
hCG1640230	1,60	protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	PPM1D
hCG45292	1,60	lysosomal-associated membrane protein 1	LAMP1
hCG2043377	1,60	unassigned	unassigned
hCG40852	1,60	histone 1, H2bm	HIST1H2BM
hCG40366	1,59	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	GZMA
hCG1640162	1,59	acyl-CoA thioesterase 9	ACOT9
hCG23806	1,59	chromosome 18 open reading frame 10	C18orf10
hCG2017321	1,59	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B	PPP1R14B
hCG39245	1,59	upregulated during skeletal muscle growth 5	USMG5
hCG15972	1,59	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	KDEL2
hCG24786	1,58	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	ST8SIA1
hCG18447	1,58	translocation associated membrane protein 1	TRAM1

hCG31621	1,58	hypothetical protein MGC3234	MGC3234
hCG27880	1,58	transmembrane protein 60	TMEM60
hCG1777390	1,58	unassigned	unassigned
hCG1641358	1,58	transmembrane protein 33	TMEM33
hCG28108	1,57	nuclear transport factor 2	NUTF2
hCG2043007	1,57	ADP-ribosylation factor 3	ARF3
hCG2041286	1,57	unassigned	unassigned
hCG1814734	1,57	OCIA domain containing 2	OCIAD2
hCG19247	1,57	N-acetylgalactosaminidase, alpha-	NAGA
hCG28204	1,57	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e	ATP6V0E
hCG1979841	1,56	cathepsin C	CTSC
hCG2009111	1,56	ribosomal protein S9	RPS9
hCG1812106	1,56	KIAA0776	KIAA0776
hCG28311	1,56	unassigned	unassigned
hCG21372	1,55	chromosome 1 open reading frame 144	C1orf144
hCG401304	1,55	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (yeast)	SUMO3
hCG1773599	1,55	unassigned	unassigned
hCG38230	1,55	down-regulated by Ctnnb1, a	DRCTNNB1A
hCG22866	1,55	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 4	KCNQ4
hCG41100	1,54	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	MIF
hCG22348	1,54	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	TMED10
hCG1791262	1,54	coatamer protein complex, subunit gamma	COPG
hCG41251	1,53	unassigned	unassigned
hCG31486	1,53	transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	TMED5
hCG1784812	1,52	cell division cycle 26	CDC26
hCG18986	1,52	ring-box 1	RBX1
hCG49857	1,52	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQO1
hCG38882	1,52	phosphoglucosyltransferase 2	PGM2
hCG19515	1,52	GPAA1P anchor attachment protein 1 homolog (yeast)	GPAA1
hCG32717	1,52	thioredoxin domain containing 12 (endoplasmic reticulum)	TXNDC12
hCG20191	1,51	interleukin 1 receptor accessory protein	IL1RAP
hCG33494	1,51	anterior pharynx defective 1 homolog B (C. elegans)	APH1B
hCG14802	1,51	splicing factor, arginine/serine-rich 3	SFRS3
hCG40222	1,51	chromosome 1 open reading frame 22	C1orf22
hCG1980975	1,51	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRPA1
hCG2019614	1,51	unassigned	unassigned
hCG2021985	1,51	phosphohistidine phosphatase 1	PHPT1
hCG2026222	1,50	unassigned	unassigned
hCG38810	1,50	unassigned	unassigned
hCG38650	1,50	unassigned	unassigned
hCG1978654	1,50	unassigned	unassigned

hCG32325	1,50	ADP-ribosylation factor 5	ARF5
hCG1640867	1,49	unassigned	unassigned
hCG40796	1,49	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	RCN2
hCG39182	1,49	hypothetical protein FLJ13448	FLJ13448
hCG1784270	1,49	unassigned	unassigned
hCG40725	1,49	soc-2 suppressor of clear homolog (C. elegans)	SHOC2
hCG41069	1,48	polymerase (DNA-directed), epsilon 4 (p12 subunit)	POLE4
hCG14748	1,48	enthoprotin	ENTH
hCG24000	1,48	ribosomal protein L8	RPL8
hCG96444	1,48	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	CD2BP2
hCG40448	1,46	ferritin, light polypeptide	FTL
hCG24821	1,46	unassigned	unassigned
hCG2010534	1,46	LIM domain kinase 2	LIMK2
hCG31798	1,45	unc-119 homolog (C. elegans)	UNC119
hCG1646598	1,45	unassigned	unassigned
hCG40907	1,45	KIAA1333	KIAA1333
hCG16304	1,45	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa	ARPC2
hCG22825	1,45	golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)	GOLPH3
hCG1641666	1,44	unassigned	unassigned
hCG32373	1,43	RAB31, member RAS oncogene family	RAB31
hCG20344	1,41	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	AKR1B1
hCG15433	1,41	coiled-coil domain containing 12	CCDC12
hCG21875	1,41	nucleoporin 37kDa	NUP37
hCG1642933	1,40	unassigned	unassigned
REPRESSED			
Gene ID	Fold Change	Gene Name	Gene symbol
hCG15959	0,13	NDRG family member 4	NDRG4
hCG37534	0,14	complement component 6	C6
hCG19652	0,19	unassigned	unassigned
hCG38015	0,21	zinc finger and BTB domain containing 16	ZBTB16
hCG2023558	0,22	unassigned	unassigned
hCG30022	0,23	gasdermin-like	GSDML
hCG1735841	0,23	alpha-2-glycoprotein 1, zinc	AZGP1
hCG41066	0,25	hexokinase 2	HK2
hCG22409	0,25	WD repeat domain 24	WDR24
hCG33453	0,26	EF-hand domain family, member D1	EFHD1
hCG1792507	0,27	unassigned	unassigned
hCG1730040	0,29	hypothetical protein DKFZp547G183	DKFZp547G183
hCG1730122	0,29	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2	NAALAD2
hCG36798	0,29	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	KCNMB1
hCG1993275	0,29	unassigned	unassigned
hCG1747080	0,29	solute carrier organic anion transporter family, member	SLCO2A1

		2A1	
hCG17557	0,29	inter-alpha (globulin) inhibitor H3	ITIH3
hCG2027587	0,29	hypothetical protein MGC11324	MGC11324
hCG22547	0,29	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member a	PTPLA
hCG18989	0,30	Williams Beuren syndrome chromosome region 14	MLXIPL
hCG2041746	0,30	unassigned	unassigned
hCG33715	0,31	solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3	SLC22A3
hCG2036793	0,31	unassigned	unassigned
hCG42582	0,31	CG9886-like	GLYCTK
hCG1780956	0,31	cell death-inducing DFFA-like effector a	CIDEA
hCG1775249	0,32	platelet endothelial aggregation receptor 1	PEAR1
hCG15760	0,32	chromosome 1 open reading frame 95	C1orf95
hCG1642675	0,33	putative small membrane protein NID67	NID67
hCG39734	0,33	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 (+) polypeptide	ATP1A2
hCG2022618	0,33	unassigned	unassigned
hCG1750237	0,33	unassigned	unassigned
hCG1817735	0,33	hypothetical protein LOC339942	LOC339942
hCG1811104	0,33	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2	ECHDC2
hCG23322	0,34	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2	GPT2
hCG2033443	0,34	unassigned	unassigned
hCG1818412	0,34	unassigned	unassigned
hCG2038096	0,34	unassigned	unassigned
hCG1984783	0,35	unassigned	unassigned
hCG1986472	0,35	armadillo repeat containing 7	ARMC7
hCG25499	0,35	creatine kinase, brain	CKB
hCG28852	0,35	vasoactive intestinal peptide receptor 1	VIPR1
hCG30688	0,35	zinc finger protein 179	ZNF179
hCG24831	0,35	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	PFKFB3
hCG2031619	0,35	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	TAL1
hCG1771704	0,35	PHD finger protein 12	PHF12
hCG1738740	0,35	hypothetical protein FLJ12700	FLJ12700
hCG1987566	0,36	unassigned	unassigned
hCG2036601	0,36	unassigned	unassigned
hCG18590	0,36	calpain 6	CAPN6
hCG2015310	0,36	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	ACACB
hCG1746201	0,36	mal, T-cell differentiation protein	MAL
hCG1986488	0,36	unassigned	unassigned
hCG1981875	0,37	unassigned	unassigned
hCG1736878	0,37	unassigned	unassigned
hCG37669	0,37	Usher syndrome 1C binding protein 1	USHBP1
hCG2039886	0,37	unassigned	unassigned

hCG41798	0,37	hypothetical protein FLJ20699	FLJ20699
hCG34450	0,37	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 1	SLC26A1
hCG25390	0,37	tetraspanin 18	TSPAN18
hCG1641238	0,38	immunoglobulin superfamily, member 4D	IGSF4D
hCG27629	0,38	EGF-like-domain, multiple 7	EGFL7
hCG2019331	0,38	unassigned	unassigned
hCG19817	0,38	histone deacetylase 6	HDAC6
hCG2004088	0,38	unassigned	unassigned
hCG40169	0,38	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	PCK2
hCG23738	0,38	unassigned	unassigned
hCG28101	0,38	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 6	SLC7A6
hCG2040242	0,38	olfactory receptor, family 56, subfamily A, member 3	OR56A3
hCG28486	0,39	unassigned	unassigned
hCG23666	0,39	RAS-like, family 12	RASL12
hCG31445	0,39	target of myb1-like 2 (chicken)	TOM1L2
hCG21534	0,39	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 18	SLC25A18
hCG1985588	0,39	unassigned	unassigned
hCG2042635	0,39	unassigned	unassigned
hCG2007960	0,39	unassigned	unassigned
hCG2040107	0,39	peripherin	PRPH
hCG2019705	0,39	zinc finger protein 343	ZNF343
hCG1999761	0,39	zinc finger protein 486	ZNF486
hCG32870	0,39	forkhead box P4	FOXP4
hCG2018159	0,39	unassigned	unassigned
hCG23346	0,40	neuropeptide FF-amide peptide precursor	NPFF
hCG2014610	0,40	tensin like C1 domain containing phosphatase (tensin 2)	TENC1
hCG2024684	0,40	cadherin-like 23	CDH23
hCG1818626	0,40	unassigned	unassigned
hCG1988244	0,40	hypothetical protein FLJ14397	FLJ14397
hCG40301	0,40	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	ITPR3
hCG38708	0,40	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	GABRE
hCG1996962	0,40	unassigned	unassigned
hCG32216	0,40	T-box 2	TBX2
hCG1811169	0,40	tumor protein p53 inducible protein 11	TP53I11
hCG2025760	0,40	odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)	ODZ3
hCG2008714	0,41	unassigned	unassigned
hCG1640698	0,41	retinoic acid induced 2	RAI2
hCG2014011	0,41	adenylate cyclase 4	ADCY4
hCG1811536	0,41	chromosome X open reading frame 6	CXorf6
hCG2017599	0,41	unassigned	unassigned
hCG32184	0,41	forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)	FOXO1A
hCG2004161	0,41	transmembrane protein 29	TMEM29

hCG2012301	0,41	unassigned	unassigned
hCG22740	0,41	ret proto-oncogene (multiple endocrine neoplasia and medullary thyroid carcinoma 1, Hirschsprung disease)	RET
hCG1641215	0,41	plasmalemma vesicle associated protein	PLVAP
hCG1998342	0,42	unassigned	unassigned
hCG1811059	0,42	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	PLCB1
hCG39613	0,42	phospholipase C, beta 4	PLCB4
hCG1979350	0,42	unassigned	unassigned
hCG1820430	0,42	unassigned	unassigned
hCG1987107	0,42	chromosome 17 open reading frame 28	C17orf28
hCG33410	0,42	aminoadipate-semialdehyde synthase	AASS
hCG41093	0,42	gamma-glutamyltransferase-like activity 1	GGTLA1
hCG2038353	0,42	unassigned	unassigned
hCG2028285	0,42	unassigned	unassigned
hCG2002012	0,42	von Willebrand factor	VWF
hCG27416	0,42	cisplatin resistance-associated overexpressed protein	CROP
hCG40645	0,42	La ribonucleoprotein domain family, member 6	LARP6
hCG32610	0,42	storkhead box 1	STOX1
hCG25606	0,42	leucine-rich repeat LGI family, member 4	LGI4
hCG14741	0,42	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	AGT
hCG15537	0,42	MAS-related GPR, member X3	MRGPRX3
hCG1749090	0,42	CD300 antigen like family member G	CD300LG
hCG22877	0,43	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase	breast epithelial mucin-associated antigen)
hCG1639762	0,43	H2A histone family, member J	H2AFJ
hCG27760	0,43	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)	NFIX
hCG2039992	0,43	unassigned	unassigned
hCG1778365	0,43	hypothetical protein FLJ20032	FLJ20032
hCG41733	0,43	embryonal Fyn-associated substrate	EFS
hCG2015613	0,43	hypothetical protein MGC16384	MGC16384
hCG24383	0,43	DKFZP564O0823 protein	DKFZP564O0823
hCG19354	0,43	Williams-Beuren syndrome chromosome region 17	WBSCR17
hCG27883	0,43	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like	MCF2L
hCG2013041	0,43	unassigned	unassigned
hCG2042647	0,43	unassigned	unassigned
hCG2042277	0,43	unassigned	unassigned
hCG1988218	0,43	latent transforming growth factor beta binding protein 1	LTBP1
hCG41615	0,43	hypothetical LOC339483	LOC339483
hCG21088	0,43	unassigned	unassigned
hCG32578	0,43	mannosidase, alpha, class 2A, member 2	MAN2A2
hCG43754	0,43	cysteine sulfinic acid decarboxylase	CSAD
hCG28318	0,44	cullin-associated and neddylation-dissociated 2 (putative)	CAND2

hCG1748359	0,44	jagged 2	JAG2
hCG2042999	0,44	blocked early in transport 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)-like	BET1L
hCG15043	0,44	solute carrier family 6, member 16	SLC6A16
hCG23359	0,44	activating transcription factor 7	ATF7
hCG2009527	0,45	unassigned	unassigned
hCG1739384	0,45	mannosidase, alpha, class 2C, member 1	MAN2C1
hCG2036515	0,45	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	PTP4A3
hCG1782583	0,45	POU domain, class 6, transcription factor 1	POU6F1
hCG1640181	0,45	potassium channel, subfamily K, member 12	KCNK12
hCG2005550	0,45	unassigned	unassigned
hCG1811820	0,45	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase	PHLPP
hCG2038839	0,45	unassigned	unassigned
hCG17112	0,45	laminin, beta 1	LAMB1
hCG33197	0,45	molybdenum cofactor synthesis 1	MOCS1
hCG23312	0,45	chromosome 10 open reading frame 10	C10orf10
hCG2042973	0,45	chemokine-like factor superfamily 8	CKLFSF8
hCG15283	0,45	fms-related tyrosine kinase 4	FLT4
hCG1813899	0,45	roundabout homolog 4, magic roundabout (<i>Drosophila</i>)	ROBO4
hCG40461	0,46	bruno-like 6, RNA binding protein (<i>Drosophila</i>)	BRUNOL6
hCG41268	0,46	cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	CYP26B1
hCG41484	0,46	alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide	ADH1B
hCG2024612	0,46	tetratricopeptide repeat domain 18	TTC18
hCG1996760	0,46	unassigned	unassigned
hCG26498	0,46	metallophosphoesterase domain containing 2	MPPED2
hCG20257	0,46	choline kinase alpha	CHKA
hCG1991380	0,46	unassigned	unassigned
hCG1984771	0,46	unassigned	unassigned
hCG23993	0,46	SWAP-70 protein	SWAP70
hCG1742895	0,46	hypothetical protein LOC285989	LOC285989
hCG41706	0,46	unc-84 homolog B (<i>C. elegans</i>)	UNC84B
hCG19927	0,46	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	HEY1
hCG30196	0,46	chromosome 9 open reading frame 58	C9orf58
hCG2006173	0,46	hypothetical protein LOC153684	LOC153684
hCG23276	0,46	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	MAP3K11
hCG28014	0,46	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	GPD1L
hCG22364	0,46	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1	GABBR1
hCG41801	0,47	peroxisome proliferative activated receptor, alpha	PPARA
hCG28120	0,47	hypothetical protein FLJ13111	FLJ13111
hCG27799	0,47	frizzled homolog 4 (<i>Drosophila</i>)	FZD4
hCG1811019	0,47	SEC31-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	SEC31L2
hCG1993634	0,47	unassigned	unassigned
hCG22967	0,47	transmembrane protein 44	TMEM44
hCG21286	0,47	potassium channel tetramerisation domain containing	KCTD15

		15	
hCG23403	0,47	phosphorylase, glycogen	PYGM
hCG26932	0,47	adenylate cyclase 6	ADCY6
hCG28354	0,47	N-glycanase 1	NGLY1
hCG38087	0,47	unassigned	unassigned
hCG15158	0,47	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)	AHSA2
hCG1749581	0,47	adenylate cyclase 2 (brain)	ADCY2
hCG22401	0,47	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1	SPSB1
hCG1987939	0,47	G protein-coupled receptor associated sorting protein 1	GPRASP1
hCG22545	0,47	SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)	SMAD7
hCG1817936	0,47	chromosome 16 open reading frame 30	C16orf30
hCG1820960	0,47	hypothetical protein LOC153561	LOC153561
hCG1812045	0,48	development and differentiation enhancing factor-like 1	DDEFL1
hCG30333	0,48	complement component 5	C5
hCG1745116	0,48	unassigned	unassigned
hCG30537	0,48	chromosome 9 open reading frame 61	C9orf61
hCG23630	0,48	nicalin homolog (zebrafish)	NCLN
hCG1791860	0,48	unassigned	unassigned
hCG24792	0,48	tubulin tyrosine ligase-like family, member 7	TTLL7
hCG2029889	0,48	unassigned	unassigned
hCG25143	0,48	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	KCNMB4
hCG1818507	0,48	hypothetical protein DKFZp761O2018	DKFZp761O2018
hCG1793559	0,48	tripartite motif-containing 52	TRIM52
hCG2044817	0,48	unassigned	unassigned
hCG1995620	0,48	unassigned	unassigned
hCG37927	0,48	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier	SLC25A10
hCG2039743	0,48	unassigned	unassigned
hCG2036879	0,48	unassigned	unassigned
hCG21240	0,48	pinin, desmosome associated protein	PNN
hCG1745281	0,48	zinc finger, DHHC-type containing 8	ZDHHC8
hCG31745	0,48	hypothetical protein MGC25181	MGC25181
hCG2001933	0,48	DiGeorge syndrome critical region gene 8	DGCR8
hCG38689	0,48	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	APCDD1
hCG22780	0,48	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17	ARHGEF17
hCG21685	0,48	collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)	COL4A5
hCG16892	0,48	solute carrier family 25, member 27	SLC25A27
hCG2036582	0,48	unassigned	unassigned
hCG1644689	0,49	unassigned	unassigned
hCG1749912	0,49	keratin associated protein 3-1	KRTAP3-1
hCG19814	0,49	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)	SUV39H1
hCG21049	0,49	RAD9 homolog A (S. pombe)	RAD9A
hCG1807576	0,49	unassigned	unassigned

hCG40341	0,49	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)	BAP1
hCG21246	0,49	angel homolog 1 (Drosophila)	ANGEL1
hCG21040	0,49	cat eye syndrome chromosome region, candidate 5	CECR5
hCG2001875	0,49	IQ motif and Sec7 domain 3	IQSEC3
hCG1980706	0,49	centaurin, delta 3	CENTD3
hCG2040189	0,49	unassigned	unassigned
hCG1788534	0,49	unassigned	unassigned
hCG1982215	0,49	unassigned	unassigned
hCG37513	0,49	unassigned	unassigned
hCG37341	0,49	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	ARHGEF4
hCG2000337	0,49	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	COX11
hCG2011693	0,49	unassigned	unassigned
hCG2006898	0,49	unassigned	unassigned
hCG1820391	0,49	unassigned	unassigned
hCG2041619	0,49	unassigned	unassigned
hCG2043058	0,49	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)	CDC42BPA
hCG31851	0,49	tubulin, gamma complex associated protein 6	TUBGCP6
hCG26001	0,49	mediator of DNA damage checkpoint 1	MDC1
hCG17370	0,49	unassigned	unassigned
hCG21751	0,49	chromosome 14 open reading frame 102	C14orf102
hCG1811878	0,49	splicing factor, arginine/serine-rich 8 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	SFRS8
hCG37717	0,49	PDZ domain containing 6	PDZK6
hCG2041670	0,49	unassigned	unassigned
hCG1738065	0,49	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex like (S. pombe)	CABC1
hCG37559	0,49	unassigned	unassigned
hCG23629	0,50	nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)	NFIC
hCG15583	0,50	ATG9 autophagy related 9 homolog A (S. cerevisiae)	ATG9A
hCG1982738	0,50	chromosome 19 open reading frame 12	C19orf12
hCG17171	0,50	KIAA0907	KIAA0907
hCG1745077	0,50	unassigned	unassigned
hCG37040	0,50	acid phosphatase 6, lysophosphatidic	ACP6
hCG1780065	0,50	unassigned	unassigned
hCG1749411	0,50	glycogen synthase 1 (muscle)	GYS1
hCG16180	0,50	unassigned	unassigned
hCG2029617	0,50	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2	RPS6KA2
hCG37967	0,50	activin A receptor type II-like 1	ACVRL1
hCG1990634	0,50	unassigned	unassigned
hCG25645	0,50	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	MGEA5
hCG1810813	0,50	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) associated protein	MCM3AP
hCG40654	0,50	ZXD family zinc finger C	ZXDC
hCG1804364	0,50	cat eye syndrome chromosome region, candidate 4	CECR4

hCG2024927	0,50	unassigned	unassigned
hCG26638	0,50	zinc finger protein 177	ZNF177
hCG31855	0,50	selenoprotein O	SELO
hCG23000	0,50	genethonin 1	GENX-3414
hCG1987078	0,50	KIAA1841 protein	KIAA1841
hCG1992407	0,50	unassigned	unassigned
hCG16118	0,50	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	ENTPD3
hCG40717	0,50	nuclear receptor binding protein 2	NRBP2
hCG1770450	0,50	zinc finger protein 11B	ZNF11B
hCG28320	0,50	tRNA splicing endonuclease 2 homolog (SEN2, <i>S. cerevisiae</i>)	TSEN2
hCG37492	0,51	actin binding LIM protein family, member 3	ABLIM3
hCG2039385	0,51	similar to lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B	G5b protein
hCG21723	0,51	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	ALDH6A1
hCG1786715	0,51	unassigned	unassigned
hCG1986627	0,51	SEC14-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	SEC14L1
hCG23121	0,51	RGM domain family, member A	RGMA
hCG15799	0,51	putative acyl-CoA dehydrogenase	FLJ12592
hCG2040047	0,51	unassigned	unassigned
hCG401190	0,51	male-specific lethal 3-like 1 (<i>Drosophila</i>)	MSL3L1
hCG1982206	0,51	protocadherin beta 10	PCDHB10
hCG23776	0,51	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3	SLC29A3
hCG1811981	0,51	suppressor of hairy wing homolog 4 (<i>Drosophila</i>)	SUHW4
hCG2000729	0,51	RNA binding motif protein 33	RBM33
hCG1783917	0,51	unassigned	unassigned
hCG23303	0,51	MUS81 endonuclease homolog (yeast)	MUS81
hCG1777277	0,51	vestigial like 4 (<i>Drosophila</i>)	VGLL4
hCG1994985	0,51	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	CHL1
hCG2019616	0,51	FK506 binding protein 1A, 12kDa	FKBP1A
hCG1817895	0,51	unassigned	unassigned
hCG1821258	0,51	hypothetical protein FLJ32752	FLJ32752
hCG2020181	0,52	hypothetical gene CG012	CG012
hCG1999152	0,52	unassigned	unassigned
hCG24885	0,52	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	DHTKD1
hCG2041308	0,52	unassigned	unassigned
hCG40299	0,52	dishevelled, dsh homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	DVL3
hCG18518	0,52	alanyl-tRNA synthetase like	AARSL
hCG20180	0,52	WD repeat domain 60	WDR60
hCG14832	0,52	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	LDLOC1
hCG1997371	0,52	unassigned	unassigned
hCG23163	0,52	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	TIE1
hCG96430	0,52	endo-beta-N-acetylglucosaminidase	FLJ21865

hCG23965	0,52	ankyrin repeat domain 47	ANKRD47
hCG2001997	0,52	unassigned	unassigned
hCG15814	0,52	clathrin, heavy polypeptide-like 1	CLTCL1
hCG30894	0,52	likely ortholog of mouse ubiquitin-conjugating enzyme E2-230K	E2-230K
hCG2017116	0,52	unassigned	unassigned
hCG25025	0,52	maternally expressed 3	MEG3
hCG15278	0,53	hypothetical LOC51149	LOC51149
hCG25943	0,53	peroxisomal biogenesis factor 5	PEX5
hCG1771751	0,53	unassigned	unassigned
hCG2025340	0,53	unassigned	unassigned
hCG1989987	0,53	unassigned	unassigned
hCG1790802	0,53	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	GOLGA8A
hCG2036598	0,53	immunoglobulin superfamily, member 9B	IGSF9B
hCG18206	0,53	cyclin D binding myb-like transcription factor 1	DMTF1
hCG1741841	0,53	unassigned	unassigned
hCG1643759	0,53	transducer of erbB-2 2 related gene	LOC222699
hCG16022	0,53	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	BCL6
hCG2020245	0,53	unassigned	unassigned
hCG38814	0,53	chromosome 20 open reading frame 160	C20orf160
hCG2039155	0,53	unassigned	unassigned
hCG2031127	0,53	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	ARID1B
hCG1820892	0,53	unassigned	unassigned
hCG96721	0,53	laminin, beta 2 (laminin S)	LAMB2
hCG2007494	0,53	GCN5 general control of amino-acid synthesis 5-like 2 (yeast)	GCN5L2
hCG15437	0,53	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain	ACADL
hCG2039439	0,53	zinc finger protein 137 (clone pHZ-30)	ZNF137
hCG2039583	0,53	RUN and SH3 domain containing 1	RUSC1
hCG401183	0,53	unassigned	unassigned
hCG1646677	0,53	sodium channel, voltage-gated, type IV, beta	SCN4B
hCG1807742	0,53	unassigned	unassigned
hCG1738619	0,53	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	DHRS3
hCG2027314	0,53	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	PPP1R12B
hCG1737117	0,54	chromosome 9 open reading frame 37	C9orf37
hCG2004877	0,54	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	RAMP2
hCG1811880	0,54	RAB6 interacting protein 2	RAB6IP2
hCG1745301	0,54	rhomboid family 1 (Drosophila)	RHBDF1
hCG19442	0,54	metastasis associated 1	MTA1
hCG2014946	0,54	unassigned	unassigned
hCG2006972	0,54	unassigned	unassigned
hCG37029	0,54	protein inhibitor of activated STAT, 3	PIAS3
hCG19245	0,54	adenylate cyclase 1 (brain)	ADCY1
hCG1785890	0,54	reticulon 1	RTN1

hCG1745198	0,54	polymerase (DNA directed), mu	POLM
hCG31704	0,54	unassigned	unassigned
hCG25020	0,54	solute carrier family 25, member 29	SLC25A29
hCG20493	0,54	mutL homolog 3 (E. coli)	MLH3
hCG1997495	0,54	unassigned	unassigned
hCG2016942	0,54	unassigned	unassigned
hCG1817226	0,54	unassigned	unassigned
hCG40195	0,54	unassigned	unassigned
hCG1776607	0,54	unassigned	unassigned
hCG2029542	0,54	WD repeat domain 27	WDR27
hCG1998275	0,54	unassigned	unassigned
hCG2009593	0,55	unassigned	unassigned
hCG2038971	0,55	unassigned	unassigned
hCG2036633	0,55	hypothetical protein LOC125893	LOC125893
hCG2003033	0,55	unassigned	unassigned
hCG2033841	0,55	hypothetical protein FLJ39378	FLJ39378
hCG2043608	0,55	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3	GDPD3
hCG29512	0,55	dedicator of cytokinesis 9	DOCK9
hCG24012	0,55	zinc finger protein 251	ZNF251
hCG39375	0,55	SET domain, bifurcated 1	SETDB1
hCG1737100	0,55	cofactor of BRCA1	COBRA1
hCG1818404	0,55	hypothetical protein MGC5457	MGC5457
hCG2040657	0,55	unassigned	unassigned
hCG2043524	0,55	unassigned	unassigned
hCG1641254	0,55	zinc finger protein 364	ZNF364
hCG31280	0,55	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 15	ARHGEF15
hCG41624	0,55	unassigned	unassigned
hCG1988475	0,55	unassigned	unassigned
hCG1747212	0,55	zinc finger protein 479	ZNF479
hCG1772363	0,55	hypothetical protein LOC147650	LOC147650
hCG91961	0,55	zinc finger protein 577	ZNF577
hCG20768	0,55	gephyrin	GPHN
hCG2043176	0,55	unassigned	unassigned
hCG2012697	0,55	unassigned	unassigned
hCG25190	0,55	formin binding protein 4	FNBP4
hCG1788532	0,55	zinc finger protein 585A	ZNF585A
hCG1992435	0,55	tuberous sclerosis 2	TSC2
hCG2032915	0,55	unassigned	unassigned
hCG1998004	0,55	unassigned	unassigned
hCG1818558	0,55	unassigned	unassigned
hCG37259	0,55	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 8	ACAD8
hCG1776095	0,55	WW domain binding protein 2	WBP2
hCG40464	0,55	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 6	PARP6

hCG1995170	0,55	unassigned	unassigned
hCG2000022	0,55	natural killer-tumor recognition sequence	NKTR
hCG19279	0,55	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	SLC27A3
hCG17635	0,55	chromosome 20 open reading frame 3	C20orf3
hCG42593	0,55	hypothetical protein MGC15429	MGC15429
hCG2014051	0,55	casein kinase 1, epsilon	CSNK1E
hCG1781559	0,55	B-cell CLL/lymphoma 7A	BCL7A
hCG36828	0,56	KIAA0141	KIAA0141
hCG1980824	0,56	ankyrin repeat domain 11	ANKRD11
hCG28762	0,56	KIAA0368	KIAA0368
hCG2019603	0,56	unassigned	unassigned
hCG16177	0,56	zinc finger protein 467	ZNF467
hCG201538	0,56	zinc finger protein 567	ZNF567
hCG2039678	0,56	keratin 16 (focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma)	KRT16
hCG1787965	0,56	sex comb on midleg homolog 1 (Drosophila)	SCMH1
hCG38468	0,56	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, C, 110kDa	TAF1C
hCG39527	0,56	MCM8 minichromosome maintenance deficient 8 (S. cerevisiae)	MCM8
hCG2010626	0,56	RNA binding motif protein 9	RBM9
hCG20021	0,56	unassigned	unassigned
hCG2032140	0,56	single stranded DNA binding protein 3	SSBP3
hCG18088	0,56	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2	WHSC2
hCG1644246	0,56	olfactory receptor, family 1, subfamily A, member 1	OR1A1
hCG22138	0,56	splicing factor, arginine/serine-rich 16 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	SFRS16
hCG18046	0,56	coagulation factor VIII, procoagulant component (hemophilia A)	F8
hCG40735	0,56	glucosidase I	GCS1
hCG27797	0,56	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	ME3
hCG19065	0,56	hook homolog 3 (Drosophila)	HOOK3
hCG27521	0,56	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	PRKACA
hCG1775437	0,56	unassigned	unassigned
hCG21916	0,56	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1	PLEKHH1
hCG42028	0,56	unassigned	unassigned
hCG2043041	0,56	pleiomorphic adenoma gene-like 1	PLAGL1
hCG1811466	0,56	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	ARHGEF7
hCG1775842	0,56	unassigned	unassigned
hCG401275	0,56	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	ADARB1
hCG22763	0,57	uridine-cytidine kinase 1-like 1	UCKL1
hCG1643712	0,57	unassigned	unassigned
hCG20391	0,57	unassigned	unassigned
hCG27868	0,57	chromosome 1 open reading frame 164	C1orf164
hCG2039436	0,57	mitogen-activated protein kinase 11	MAPK11

hCG22782	0,57	adenylate cyclase 3	ADCY3
hCG2011440	0,57	unassigned	unassigned
hCG2032963	0,57	SNF1-like kinase 2	SNF1LK2
hCG29660	0,57	GTPase activating protein and VPS9 domains 1	GAPVD1
hCG15431	0,57	huntingtin interacting protein B	HYPB
hCG27405	0,57	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5	GDPD5
hCG36734	0,57	unassigned	unassigned
hCG22723	0,57	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain	ACOX2
hCG401247	0,57	chromosome 21 open reading frame 25	C21orf25
hCG2041200	0,57	unassigned	unassigned
hCG34451	0,57	iduronidase, alpha-L-	IDUA
hCG2006468	0,57	unassigned	unassigned
hCG20480	0,57	phosphatidylinositol glycan, class O	PIGO
hCG40352	0,57	F-box and WD-40 domain protein 8	FBXW8
hCG32448	0,57	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3	KHDRBS3
hCG1984476	0,57	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	FABP5
hCG17308	0,57	aminoadipate aminotransferase	AADAT
hCG1812845	0,57	zinc finger and BTB domain containing 40	ZBTB40
hCG1786640	0,57	START domain containing 9	STARD9
hCG22634	0,58	PHD finger protein 13	PHF13
hCG33378	0,58	A kinase (PRKA) anchor protein 1	AKAP1
hCG1642153	0,58	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7	CHST7
hCG23169	0,58	hydroxypyruvate isomerase homolog (E. coli)	HYI
hCG1995361	0,58	hypothetical protein FLJ37549	FLJ37549
hCG2042785	0,58	CXXC finger 6	CXXC6
hCG21167	0,58	zinc finger protein 629	ZNF629
hCG2043344	0,58	unassigned	unassigned
hCG25783	0,58	MMS19-like (MET18 homolog, S. cerevisiae)	MMS19L
hCG20814	0,58	hypothetical BC282485_1	LOC388554
hCG1774619	0,58	poly(A) binding protein, cytoplasmic 3	PABPC3
hCG41745	0,58	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 17	SLC22A17
hCG1781461	0,58	unassigned	unassigned
hCG1745047	0,58	unassigned	unassigned
hCG16871	0,58	SAPS domain family, member 2	SAPS2
hCG1984861	0,58	vacuolar protein sorting 13A (yeast)	VPS13A
hCG1743404	0,58	chromosome X open reading frame 45	CXorf45
hCG2023324	0,58	unassigned	unassigned
hCG2000452	0,58	zinc finger protein 708 (KOX8)	ZNF708
hCG1738778	0,58	unassigned	unassigned
hCG18361	0,58	insulin receptor substrate 1	IRS1
hCG37816	0,58	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 3 (S. cerevisiae)	SIRT3

hCG26635	0,58	cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)	CDH5
hCG17282	0,58	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2
hCG24100	0,58	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	PDE2A
hCG23736	0,59	tetraspanin 14	TSPAN14
hCG1777063	0,59	XIAP associated factor-1	BIRC4BP
hCG23105	0,59	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	FGFR1
hCG1810814	0,59	ATPase, Class II, type 9B	ATP9B
hCG39941	0,59	bromodomain containing 8	BRD8
hCG1647537	0,59	unassigned	unassigned
hCG1983585	0,59	hypothetical protein LOC96597	LOC96597
hCG2003719	0,59	polyhomeotic-like 1 (Drosophila)	PHC1
hCG22425	0,59	LUC7-like (S. cerevisiae)	LUC7L
hCG1820836	0,59	unassigned	unassigned
hCG36904	0,59	LETM1 domain containing 1	LETMD1
hCG2040712	0,59	unassigned	unassigned
hCG2036850	0,59	tumor suppressor candidate 5	TUSC5
hCG2001462	0,59	myo-inositol 1-phosphate synthase A1	ISYNA1
hCG41777	0,59	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1	SS18L1
hCG21163	0,59	fibrosin 1	FBS1
hCG2015927	0,59	methyl-CpG binding domain protein 6	MBD6
hCG37990	0,59	POU domain, class 2, transcription factor 1	POU2F1
hCG2040345	0,59	FAM51A1 pseudogene	LOC492303
hCG1739393	0,59	nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)	NEIL1
hCG38256	0,59	neuro-oncological ventral antigen 1	NOVA1
hCG1642121	0,59	unassigned	unassigned
hCG30098	0,59	RNA (guanine-9-) methyltransferase domain containing 3	RG9MTD3
hCG41522	0,59	zinc finger protein 278	ZNF278
hCG2032202	0,59	phosphatase and actin regulator 4	PHACTR4
hCG37902	0,60	CDK5 regulatory subunit associated protein 1	CDK5RAP1
hCG40156	0,60	hepatocellularcarcinoma-associated antigen HCA557a	DKFZP586D0919
hCG1730394	0,60	pre-mRNA cleavage factor I, 59 kDa subunit	FLJ12529
hCG1788527	0,60	hypothetical protein FLJ23436	FLJ23436
hCG2036803	0,60	hypothetical protein MGC45840	MGC45840
hCG41906	0,60	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2	PACSIN2
hCG28118	0,60	solute carrier family 7, member 6 opposite strand	SLC7A6OS
hCG2032281	0,60	microtubule associated serine/threonine kinase 2	MAST2
hCG27817	0,60	gem (nuclear organelle) associated protein 4	GEMIN4
hCG2007192	0,60	cancer susceptibility candidate 3	CASC3
hCG16486	0,60	casein kinase 2, alpha prime polypeptide	CSNK2A2
hCG1817673	0,60	unassigned	unassigned
hCG1995981	0,60	GATA zinc finger domain containing 2B	GATAD2B

hCG1999370	0,60	chromosome 1 open reading frame 66	C1orf66
hCG2005638	0,60	HLA-B associated transcript 1	BAT1
hCG1820988	0,60	hypothetical protein FLJ21148	FLJ21148
hCG19300	0,60	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	MAP3K6
hCG2043024	0,60	early B-cell factor	EBF
hCG2000529	0,60	zinc finger protein 91 (HPF7, HTF10)	ZNF91
hCG18349	0,60	TAO kinase 2	TAOK2
hCG2009101	0,60	unassigned	unassigned
hCG39341	0,60	KIAA1271 protein	KIAA1271
hCG22276	0,60	KIAA1737	KIAA1737
hCG2016141	0,60	unassigned	unassigned
hCG21708	0,60	forkhead box J3	FOXJ3
hCG1983121	0,60	hypothetical protein MGC15875	MGC15875
hCG2039441	0,60	zinc finger protein 324	ZNF324
hCG2039575	0,61	retinoblastoma binding protein 6	RBBP6
hCG1640498	0,61	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1	TNFAIP8L1
hCG2042793	0,61	unassigned	unassigned
hCG2011952	0,61	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast)	UPF3A
hCG2015657	0,61	hypothetical protein FLJ38663	FLJ38663
hCG1814049	0,61	unassigned	unassigned
hCG1983140	0,61	hypothetical protein FLJ34443	FLJ34443
hCG40434	0,61	calpain 3, (p94)	CAPN3
hCG2016782	0,61	NAD synthetase 1	NADSYN1
hCG29642	0,61	radical S-adenosyl methionine domain containing 1	RSAD1
hCG23710	0,61	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	CAD
hCG23378	0,61	splicing factor 1	SF1
hCG1986920	0,61	hypothetical protein FLJ21816	FLJ21816
hCG1811572	0,61	centaurin, gamma 2	CENTG2
hCG1990782	0,61	unassigned	unassigned
hCG22359	0,61	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	DLST
hCG21954	0,61	ring finger protein 144	RNF144
hCG28439	0,61	chromosome 9 open reading frame 112	C9orf112
hCG22717	0,61	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2	MKNK2
hCG38584	0,61	mesenchyme homeo box 1	MEOX1
hCG19028	0,61	golgi reassembly stacking protein 1, 65kDa	GORASP1
hCG38489	0,61	flavin containing monooxygenase 4	FMO4
hCG1773739	0,61	KIAA0195 gene product	KIAA0195
hCG32552	0,61	hypothetical protein FLJ10769	FLJ10769
hCG18613	0,61	CTD-binding SR-like protein rA9	KIAA1542
hCG28495	0,61	tyrosine kinase 2	TYK2
hCG15822	0,61	serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1 homolog, yeast)	STK39

hCG2003663	0,61	unassigned	unassigned
hCG1988476	0,61	chromosome 16 open reading frame 34	C16orf34
hCG38955	0,61	isovaleryl Coenzyme A dehydrogenase	IVD
hCG39434	0,61	RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	RABGEF1
hCG23380	0,61	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	RASGRP2
hCG23837	0,61	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	PTPRG
hCG17722	0,61	zinc finger protein 673	ZNF673
hCG32624	0,62	zinc finger, CCHC domain containing 14	ZCCHC14
hCG39738	0,62	WD repeat domain 42A	WDR42A
hCG41340	0,62	tafazzin (cardiomyopathy, dilated 3A (X-linked)	endocardial fibroelastosis 2
hCG1640242	0,62	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)	PHKA1
hCG32062	0,62	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	NAPRT1
hCG21092	0,62	protein kinase D2	PRKD2
hCG2038549	0,62	unassigned	unassigned
hCG1778352	0,62	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon, 82kDa	EIF2B5
hCG15164	0,62	mitochondria-associated protein involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signal transduction	Magmas
hCG2033437	0,62	ELG protein	HSA277841
hCG38501	0,62	nuclear receptor coactivator 6	NCOA6
hCG1999937	0,62	unassigned	unassigned
hCG15529	0,62	unassigned	unassigned
hCG2041266	0,62	unassigned	unassigned
hCG1782561	0,62	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2	MOSC2
hCG43706	0,62	dom-3 homolog Z. (C. elegans)	DOM3Z
hCG23379	0,62	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2	MAP4K2
hCG2040283	0,62	unassigned	unassigned
hCG1779476	0,62	zinc finger, C3HC-type containing 1	ZC3HC1
hCG2039991	0,62	NCK interacting protein with SH3 domain	NCKIPSD
hCG1643292	0,62	unassigned	unassigned
hCG38065	0,62	ARP5 actin-related protein 5 homolog (yeast)	ACTR5
hCG1640328	0,62	homeo box A7	HOXA7
hCG1814199	0,62	unassigned	unassigned
hCG1640931	0,62	G protein-coupled receptor associated sorting protein 2	GPRASP2
hCG31367	0,62	glucosidase, beta (bile acid) 2	GBA2
hCG25007	0,62	hypothetical protein FLJ32452	FLJ32452
hCG1811538	0,62	MYC binding protein 2	MYCBP2
hCG2019642	0,62	unassigned	unassigned
hCG1992441	0,63	E4F transcription factor 1	E4F1
hCG1734936	0,63	unassigned	unassigned
hCG1981195	0,63	hypothetical protein FLJ10404	FLJ10404
hCG1811529	0,63	RNA binding motif protein 10	RBM10

hCG1786540	0,63	KIAA1018 protein	KIAA1018
hCG1775343	0,63	hypothetical protein MGC3032	MGC3032
hCG2021109	0,63	RAB GTPase activating protein 1	RABGAP1
hCG27444	0,63	transducer of regulated cAMP response element-binding protein (CREB) 3	TORC3
hCG38046	0,63	KIAA0406 gene product	KIAA0406
hCG17474	0,63	RNA binding motif protein 5	RBM5
hCG1983949	0,63	unassigned	unassigned
hCG2042261	0,63	unassigned	unassigned
hCG39977	0,63	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	BICD1
hCG1811404	0,63	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	EGFR
hCG2020597	0,63	unassigned	unassigned
hCG24260	0,63	TNF receptor-associated factor 5	TRAF5
hCG21861	0,63	zinc finger protein 35 (clone HF.10)	ZNF35
hCG2016168	0,63	ubiquitin specific peptidase 52	USP52
hCG1759124	0,63	hypothetical protein FLJ10707	FLJ10707
hCG2042291	0,63	zinc finger and BTB domain containing 34	ZBTB34
hCG1641566	0,63	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6	CHST6
hCG1774802	0,63	unassigned	unassigned
hCG2040546	0,63	unassigned	unassigned
hCG42404	0,63	GLI-Kruppel family member HKR1	HKR1
hCG1774426	0,63	hypothetical protein FLJ14624	FLJ14624
hCG1813987	0,63	ProSAPiP2 protein	ProSAPiP2
hCG1640838	0,64	R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis)	RSPO3
hCG32888	0,64	unassigned	unassigned
hCG1816833	0,64	hypothetical protein MGC27345	MGC27345
hCG2020280	0,64	hypothetical protein LOC149832	LOC149832
hCG1749509	0,64	unassigned	unassigned
hCG17641	0,64	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), delta isoform	PPP2R5D
hCG2030662	0,64	discoidin, CUB and LCCL domain containing 1	DCBLD1
hCG2020289	0,64	protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	PTPRA
hCG1771495	0,64	zinc finger protein 630	ZNF630
hCG1811971	0,64	mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5
hCG39731	0,64	peroxisomal biogenesis factor 19	PEX19
hCG39687	0,64	FLJ25476 protein	FLJ25476
hCG18702	0,64	argininosuccinate lyase	ASL
hCG33068	0,64	ankyrin repeat domain 6	ANKRD6
hCG1744451	0,64	unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	ULK1
hCG1989164	0,64	unassigned	unassigned
hCG19988	0,64	HD domain containing 2	HDDC2
hCG16963	0,64	Coenzyme A synthase	COASY
hCG38959	0,64	vacuolar protein sorting protein 18	VPS18

hCG2039824	0,64	prostate tumor overexpressed gene 1	PTOV1
hCG36740	0,64	unassigned	unassigned
hCG38580	0,64	splicing factor, arginine/serine-rich 14	SFRS14
hCG32190	0,64	phosphonoformate immuno-associated protein 5	PFAAP5
hCG28647	0,64	polymerase (DNA directed), gamma	POLG
hCG1991411	0,64	histone deacetylase 5	HDAC5
hCG18251	0,64	unassigned	unassigned
hCG1788380	0,64	GNAS complex locus	GNAS
hCG2003941	0,65	unassigned	unassigned
hCG28663	0,65	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3	MYST3
hCG2036584	0,65	KIAA1731	KIAA1731
hCG1640376	0,65	unassigned	unassigned
hCG25004	0,65	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2	SMARCC2
hCG22722	0,65	potassium channel tetramerisation domain containing 6	KCTD6
hCG15165	0,65	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3	DNAJA3
hCG19694	0,65	trafficking protein particle complex 2	TRAPPC2
hCG1776197	0,65	unassigned	unassigned
hCG2036867	0,65	zinc finger protein 578	ZNF578
hCG34454	0,65	GPI7 protein	GPI7
hCG15653	0,65	zinc finger protein 462	ZNF462
hCG18405	0,65	solute carrier family 25, member 28	SLC25A28
hCG1989035	0,65	neuroblastoma-amplified protein	NAG
hCG1989956	0,65	hypothetical protein FLJ39075	FLJ39075
hCG1980474	0,65	WD repeat domain 59	WDR59
hCG40998	0,65	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7L2
hCG22292	0,65	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	SF3B1
hCG2042955	0,65	Rho GTPase-activating protein	RICS
hCG20629	0,65	adducin 1 (alpha)	ADD1
hCG42007	0,65	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	ACADVL
hCG14653	0,65	parathyroid hormone receptor 1	PTHR1
hCG40187	0,66	KIAA1305	KIAA1305
hCG2005629	0,66	HLA-B associated transcript 3	BAT3
hCG2011955	0,66	CDC16 cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)	CDC16
hCG1749687	0,66	splicing factor, arginine/serine-rich 15	SFRS15
hCG96727	0,66	glutaminyl-tRNA synthetase	QARS
hCG2025277	0,66	unassigned	unassigned
hCG1643107	0,66	zinc finger protein 662	ZNF662
hCG2024189	0,66	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1	CAMSAP1
hCG1770448	0,66	zinc finger protein 37b (KOX 21)	ZNF37B
hCG30083	0,66	bromodomain containing 3	BRD3
hCG20620	0,66	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 4	LRFN4
hCG41307	0,66	unassigned	unassigned

hCG17628	0,66	zinc finger protein 337	ZNF337
hCG1810864	0,66	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	SPEN
hCG1981953	0,67	telomeric repeat binding factor 2, interacting protein	TERF2IP
hCG1739025	0,67	CDC-like kinase 3	CLK3
hCG1788910	0,67	hypothetical protein similar to KIAA0187 gene product	LOC96610
hCG1820395	0,67	unassigned	unassigned
hCG23830	0,67	Kruppel-like factor 11	KLF11
hCG2020153	0,67	RNA binding motif protein 21	RBM21
hCG1998533	0,67	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	SF3B3
hCG32403	0,67	CASP8 associated protein 2	CASP8AP2
hCG16948	0,67	TBP-1 interacting protein	TBPIP
hCG41191	0,67	SMP3 mannosyltransferase	SMP3
hCG1774090	0,67	unassigned	unassigned
hCG16913	0,67	peroxidasin homolog (Drosophila)	PXDN
hCG16912	0,67	PHD finger protein 3	PHF3
hCG29362	0,67	CDK5 regulatory subunit associated protein 3	CDK5RAP3
hCG29235	0,67	protein-O-mannosyltransferase 1	POMT1
hCG39455	0,68	chromosome 20 open reading frame 6	C20orf6
hCG2033078	0,68	similar to DLNB14	DLNB14
hCG2005799	0,68	unassigned	unassigned
hCG38134	0,68	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	PTPRM
hCG16903	0,68	hypothetical protein PRO1853	PRO1853
hCG1810936	0,68	F-box protein 9	FBXO9
hCG21057	0,68	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa	NDUFV1
hCG40416	0,68	sorting nexin 19	SNX19
hCG29918	0,68	SECIS binding protein 2	SECISBP2
hCG17629	0,68	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	ACSS1
hCG40633	0,69	solute carrier family 25, member 13 (citrin)	SLC25A13
hCG1640626	0,69	homeo box A5	HOXA5
hCG1770713	0,69	yippee-like 3 (Drosophila)	YPEL3
hCG20705	0,69	oculocerebrorenal syndrome of Lowe	OCRL
hCG41061	0,69	HtrA serine peptidase 2	HTRA2
hCG25958	0,69	atrophin 1	ATN1
hCG2043046	0,69	chromosome 10 open reading frame 28	C10orf28
hCG28243	0,69	nitrilase family, member 2	NIT2
hCG24741	0,69	chromosome 14 open reading frame 131	C14orf131
hCG39709	0,69	gamma tubulin ring complex protein (76p gene)	76P
hCG37641	0,69	hypothetical protein LOC203547	LOC203547
hCG20422	0,70	cleavage and polyadenylation specific factor 3-like	CPSF3L
hCG2005583	0,70	TAR DNA binding protein	TARDBP
hCG28731	0,70	ubiquitin associated domain containing 1	UBADC1
hCG1995143	0,70	unassigned	unassigned
hCG19870	0,70	nitrilase 1	NIT1

hCG25604	0,70	KIAA0355	KIAA0355
hCG38029	0,71	THO complex 1	THOC1
hCG2042865	0,71	protocadherin beta 15	PCDHB15
hCG2003777	0,71	ribonuclease III, nuclear	RNASEN
hCG2033105	0,72	ubiquitination factor E4A (UFD2 homolog, yeast)	UBE4A
hCG1818283	0,73	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	HERC1

SUBCUTÁNEO

SC

UPREGULATED			
Gene Id	FOLD CHANGE	Gene Name	Gene symbol
hCG2007708	11,54	unassigned	unassigned
hCG15465	9,89	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100A9
hCG1994488	9,26	unassigned	Unassigned
hCG1992646	8,27	unassigned	Unassigned
hCG1820550	8,10	unassigned	Unassigned
hCG2025429	7,94	unassigned	Unassigned
hCG2001672	7,06	unassigned	Unassigned
hCG1987993	6,62	unassigned	Unassigned
hCG1981586	6,49	unassigned	Unassigned
hCG2003055	5,99	unassigned	Unassigned
hCG2041059	5,65	unassigned	Unassigned
hCG2038940	5,35	unassigned	Unassigned
hCG1644292	5,03	hypothetical protein LOC338579	LOC338579
hCG38208	4,94	myeloid cell nuclear differentiation antigen	MNDA
hCG2041595	4,87	unassigned	Unassigned
hCG2042707	4,50	unassigned	Unassigned
hCG1983206	4,41	unassigned	Unassigned
hCG2040599	4,15	unassigned	Unassigned
hCG19661	4,09	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 2	LILRA2
hCG20476	4,05	chemokine (C-C motif) ligand 19	CCL19
hCG1742442	4,02	unassigned	Unassigned
hCG2036589	3,91	unassigned	Unassigned
hCG1981969	3,77	unassigned	Unassigned
hCG1817211	3,76	unassigned	Unassigned
hCG1811925	3,67	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	ITGA4
hCG1793060	3,36	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 3	TREML3
hCG18793	3,32	unassigned	Unassigned
hCG2041292	3,10	unassigned	Unassigned
hCG38736	3,08	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	DAPP1
hCG1789507	2,91	unassigned	Unassigned
hCG28804	2,90	ecotropic viral integration site 2B	EVI2B
hCG1980528	2,79	unassigned	Unassigned
hCG21268	2,77	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	TNFRSF11B
hCG41000	2,74	regulator of G-protein signalling 18	RGS18

hCG23079	2,73	caspase recruitment domain family, member 12	CARD12
hCG1642807	2,73	unassigned	Unassigned
hCG23967	2,71	myosin IF	MYO1F
hCG21206	2,71	pleckstrin	PLEK
hCG20915	2,70	G protein-coupled receptor 171	GPR171
hCG1790059	2,35	hypothetical protein DKFZp762F0713	DKFZp762F0713
hCG1985052	2,33	unassigned	Unassigned
hCG1811682	2,32	selectin P ligand	SELPLG
hCG1982283	2,24	unassigned	Unassigned
hCG22208	2,23	interleukin 10	IL10
hCG22037	1,88	vav 1 oncogene	VAV1
hCG1818634	1,85	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	IL2RG
hCG39986	1,71	chromosome 1 open reading frame 103	C1orf103
REPRESSED			
Gene Id	FOLD CHANGE	Gene Name	Gene symbol
hCG1770601	0,16	unassigned	Unassigned
hCG2026755	0,17	unassigned	unassigned
hCG15959	0,19	NDRG family member 4	NDRG4
hCG2042959	0,20	formin homology 2 domain containing 3	FHOD3
hCG29660	0,21	GTPase activating protein and VPS9 domains 1	GAPVD1
hCG1646516	0,23	KIAA1881	KIAA1881
hCG38015	0,24	zinc finger and BTB domain containing 16	ZBTB16
hCG32610	0,37	storkhead box 1	STOX1
hCG2004768	0,37	yjeF domain containing (E.coli)	YJDC
hCG2025760	0,38	odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)	ODZ3
hCG21534	0,38	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 18	SLC25A18
hCG24743	0,39	REST corepressor 1	RCOR1
hCG1811037	0,39	unassigned	unassigned
hCG18005	0,40	Adenylate cyclase type 5	ADCY5
hCG1983518	0,40	chromosome 8 open reading frame 34	C8orf34
hCG2014051	0,44	casein kinase 1, epsilon	CSNK1E
hCG1811465	0,45	myosin heavy chain Myr 8	MYR8
hCG23000	0,45	genethonin 1	GENX-3414
hCG1735841	0,46	alpha-2-glycoprotein 1, zinc	AZGP1
hCG39828	0,47	unassigned	unassigned
hCG2043060	0,49	unassigned	unassigned
hCG31445	0,51	target of myb1-like 2 (chicken)	TOM1L2
hCG41447	0,54	mercaptopyruvate sulfurtransferase	MPST
hCG1811630	0,56	estrogen receptor 1	ESR1
hCG40389	0,56	fatty acid synthase	FASN

hCG39683	0,57	unassigned	unassigned
hCG1988476	0,59	chromosome 16 open reading frame 34	C16orf34